

Université de Montréal

**ÉTUDE DU RÔLE DE LA MAP KINASE NON-CONVENTIONNELLE ERK3 DANS LE
DÉVELOPPEMENT THYMIQUE ET L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T**

par

Miriam Marquis

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

mai, 2009

© Miriam Marquis, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**ÉTUDE DU RÔLE DE LA MAP KINASE NON-CONVENTIONNELLE ERK3 DANS LE
DÉVELOPPEMENT THYMIQUE ET L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T**

présentée par :
Miriam Marquis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Claude Perreault, président-rapporteur
Dre Nathalie Labrecque, directrice de recherche
Dr Tarik Möröy, membre du jury
Dre Fotini Gounari, examinatrice externe
Dr Jacques Thibodeau, représentant du doyen de la FES

Sommaire

Les voies de signalisation des MAP kinases (MAPK) conventionnelles jouent des rôles essentiels pendant le développement des lymphocytes T (LT) ainsi que lors de leur activation suite à la reconnaissance antigénique. En raison de ses différences structurales ainsi que de son mode de régulation, ERK3 fait partie des MAPK dites non-conventionnelles. Encore aujourd'hui, les événements menant à l'activation de ERK3, ses substrats ou partenaires ainsi que sa fonction physiologique demeurent peu caractérisés. Nous avons entrepris dans cette thèse d'étudier le rôle de ERK3 lors du développement et de l'activation des LT en utilisant un modèle de souris déficient pour l'expression de ERK3. Nous avons premièrement établi que ERK3 est exprimée chez les thymocytes. Ensuite, nous avons évalué le développement thymique chez la souris ERK3-déficiente et nous avons observé une diminution significative de la cellularité aux étapes DN1, DP et SP CD4⁺ du développement des LT. La création de chimères hématopoïétiques ERK3-déficientes nous a permis de démontrer que la diminution du nombre de cellules observée aux étapes DN1 et DP est autonome aux thymocytes alors que le phénotype observé à l'étape SP CD4⁺ est dépendant de l'abolition simultanée de ERK3 dans l'épithélium thymique et dans les thymocytes. Une étude plus approfondie de l'étape DP nous a permis de démontrer qu'en absence de ERK3, les cellules DP meurent plus abondamment et accumulent des cassures doubles brins (DSB) dans leur ADN. De plus, nous avons démontré que ces cassures dans l'ADN sont réalisées par les enzymes RAG et qu'en absence de ces dernières, la cellularité thymique est presque rétablie chez la souris ERK3-déficiente. Ces résultats suggèrent que ERK3 est impliquée dans un mécanisme essentiel à la régulation des DSB pendant le réarrangement V(D)J de la chaîne α du récepteur des cellules T (RCT). Dans le deuxième article présenté dans cette thèse, nous avons montré que ERK3 est exprimé chez les LT périphériques, mais seulement suite à leur activation via le RCT. Une fois activés *in vitro* les LT ERK3-déficients présentent une diminution marquée de leur prolifération et dans la production de cytokines. De plus, les LT ERK3-déficients survivent de façon équivalente aux LT normaux, mais étonnamment, ils

expriment des niveaux plus faibles de la molécule anti-apoptotique Bcl-2. Ces résultats suggèrent que la prolifération réduite des LT ERK3-déficients est la conséquence d'une altération majeure de leur activation.

Ainsi, nos résultats établissent que ERK3 est une MAPK qui joue des rôles essentiels et uniques dans le développement thymique et dans l'activation des lymphocytes T périphériques. Grâce à ces travaux, nous attribuons pour la toute première fois une fonction *in vivo* pour ERK3 au cours de deux différentes étapes de la vie d'un LT.

Mots-clés : MAP kinases, ERK3, développement thymique, différenciation, prolifération, activation.

Abstract

Classical MAP kinases (MAPK) play essential roles during T cell development and activation. ERK3 is a member of the MAPK family for which no physiological function has been described yet. Also, ERK3 is an atypical MAPK since its structure and mode of regulation are different from the conventional MAPK. Even today, the events leading to ERK3 activation and its substrates or partners are still largely unknown. We have studied in this thesis the role of ERK3 during T cell development and activation by using a mouse model in which ERK3 is not expressed. First, we have established that ERK3 is expressed in thymocytes. Next, we have evaluated thymic development in ERK3-deficient mice and we have observed a significant decrease in cell number at DN1, DP and CD4SP stages of T cell development. ERK3-deficient hematopoietic chimeras revealed that the DN1 and DP phenotype are T-cell autonomous, while abrogation of CD4SP development requires ERK3-deficiency in both thymocytes and thymic epithelium. By investigating further the DP stage, we have shown that ERK3-deficient DP thymocytes are more prone to apoptosis and also accumulate DNA double-strand breaks (DSBs). Moreover, we have shown that the increase DSBs are the direct consequence of RAG activity and that abolition of RAG almost restored thymic cellularity in ERK3-deficient mice. These results suggest that ERK3 is involved in an essential mechanism of DBSs regulation during TCR α recombination. In the second article presented in this thesis, we have shown that ERK3 is expressed in peripheral T cell, but only when their TCR is activated. Also, ERK3-deficient T cells presented a strong reduction in proliferation and cytokine secretion following *in vitro* stimulation. Moreover, activated T cells lacking ERK3 are not more prone to death and surprisingly, they are unable to up-regulate the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 following TCR stimulation. These results suggest that the reduced proliferation of ERK3-deficient T cells is a consequence of their defective activation.

Collectively, our results unveil essential and unsuspected roles for ERK3 in T cell development and activation. With this study, we establish for the first time an *in vivo* function for the atypical MAPK ERK3 in two different stages during T cell life.

Keywords : T cell development, MAP kinase; ERK3, differentiation, proliferation, T cell activation.

Table des matières

Sommaire	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des Tableaux.....	ix
Liste des Figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements	xiii
Avant-propos	xv
 Introduction	 1
 1. MAP Kinases	 1
1.1 Généralités	1
1.2 Les MAPK conventionnelles	2
1.2.1 Propriétés générales et régulation des MAPK conventionnelles	2
1.2.2 Les MAPK activées par les mitogènes.....	3
1.2.3 Les MAPK activées par les stress et l'inflammation	5
1.2.3.1 Les kinases JNK/SAPK	5
1.2.3.2 Les kinases p38	7
1.2.4 ERK5.....	8
1.3 Les MAPK non-conventionnelles	9
1.3.1 Propriétés générales des MAPK non-conventionnelles	9
1.3.2 ERK3 et ERK4.....	9
1.3.2.1 Découverte et structure	9
1.3.2.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire	11
1.3.2.3 Activation, voie de signalisation et fonction.....	13
1.3.3 NLK	16
1.3.3.1 Découverte et structure	16
1.3.3.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire	17
1.3.3.3 Activation, voie de signalisation et fonction.....	17
1.3.4 ERK7.....	18
1.3.4.1 Découverte et structure	18
1.3.4.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire	19
1.3.4.3 Activation, voie de signalisation et fonction.....	19
 2. Le développement intrathymique des lymphocytes T	 20
2.1 L'origine et le développement précoce des lymphocytes T	21
2.1.1 De la cellule souche hématopoïétique au progéniteur T précoce.....	21
2.1.2 Les premières étapes du développement intrathymique	26

2.1.2.1	Les étapes précoces RCT-indépendantes	26
2.1.2.2	Les étapes précoces RCT-dépendantes	28
2.2	Le développement thymique avancé	34
2.2.1	La transition DN4 – DP	34
2.2.2	La sélection positive	39
2.2.3	La sélection négative	40
2.2.4	Le choix SP CD4 ⁺ versus SP CD8 ⁺	43
2.3	Les MAPK et le développement thymique	49
3.	La biologie des lymphocytes T périphériques	54
3.1	Survie et homéostasie des LT naïfs	55
3.2	Signalisation intracellulaire des LT périphérique	56
3.3	Les MAPK et les lymphocytes T périphériques	59
4.	Hypothèse	63
Résultats	65	
Article I. RAG-dependent accumulation of DNA double-strand breaks in CD4⁺CD8⁺ thymocytes in the absence of the MAP kinase ERK3	65	
Article II. The non-classical MAP kinase ERK3 controls T cell activation	113	
Discussion	148	
ERK3 et le développement intrathymique des LT	148	
Introduction	148	
Hypothèses, questions et discussion	150	
ERK3 et la biologie des LT périphériques	165	
Introduction	165	
Questions/perspectives et discussion	166	
Perspectives générales	169	
Conclusion	173	
Bibliographie	174	

Liste des Tableaux

<i>Tableau I :</i>	Sous-populations DN1 (CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁻).....	159
--------------------	--	-----

Liste des Figures

<i>Figure 1:</i>	Voies de signalisation des MAPK chez les mammifères.....	1
<i>Figure 2:</i>	Cascade de signalisation générale des MAPK conventionnelles.....	2
<i>Figure 3:</i>	Schématisation de la signalisation des MAPK conventionnelles.	4
<i>Figure 4:</i>	Schéma de la structure des MAP kinases mammifères.....	10
<i>Figure 5:</i>	Modèle de l'activation des complexes ERK3/ERK4 - MK5	14
<i>Figure 6:</i>	Hétérogénéité et entrée thymique des progéniteurs T.....	23
<i>Figure 7:</i>	Schématisation des étapes du développement intrathymique des LT.....	25
<i>Figure 8:</i>	Réarrangement V(D)J et NHEJ.....	29
<i>Figure 9:</i>	Signalisation pré-RCT vs RCT	30
<i>Figure 10:</i>	Voies d'apoptose intrinsèques vs extrinsèques	32
<i>Figure 11:</i>	Voies de signalisation régulées par ATM	37
<i>Figure 12:</i>	Les modèles classiques de l'engagement SP CD4 ⁺ vs SP CD8 ⁺	45
<i>Figure 13:</i>	Modèle de la cinétique de la signalisation et renversement du corécepteur	47
<i>Figure 14:</i>	Rôles des MAPK dans le développement intrathymique.....	50
<i>Figure 15:</i>	Voies de signalisation activées suivant l'activation du RCT	58
<i>Figure 16:</i>	Les MAPK chez les LT périphériques	59
<i>Figure 17:</i>	Schéma des hypothèses proposées concernant le rôle de ERK3 à l'étape DP.	154
<i>Figure 18:</i>	ERK3 joue des rôles uniques parmi les MAPK chez le LT.	171

Liste des abréviations

AIRE: autoimmune regulator)
APAF-1: apoptosis protease-activating factor-1
APECED: autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
ATM: ataxia telangiectasia mutated
BrdU: BromodioxyUridine
Cdk: Cyclin-directed kinases
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CSFE: 5,6-CarboxyFluorescein diacetate Succinimidil Ester
CSH: cellule souche hématopoïétique
DC : Cellule Dendritique
DL: Delta Like ligand
DN: Double Négatif
DNA-PK: DNA-dependent Protein Kinase
DP: Double Positif
DSB: Double Strand Breaks
DSBR: DNA Double Strand Break Repair
ERK: Extracellular-Regulated-Kinase
ETP: Early T lineage Progenitors
FTOC: Fetal Thymus Organ Culture
G-CSF: facteur stimulant les granulocytes
Hrs: heures
IL-1: Interleukine-1
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
JNK: c-Jun NH₂-terminal Kinase
LB: Lymphocyte B
LCMV: Lymphocytic ChorioMeningitis Virus
LEF: Lymphoid Enhancer Factor
LKLF: Lung Kruppel-Like Factor
LIT-1: Loss of InTestine
LT: Lymphocyte T
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAP3K: Mitogen-activated-MAPKKK
MAP2: Mitogen Activated Protein 2
MBP: Myelin Basic Protein
Mdm2: murine double minute 2
MEK: Mitogen-activated-MAPKK
MINK: NIK-related kinase misshapen-like Kinase
MKP: MAP Kinase Phosphatase

MNK: Mitogen-activated-MAPKK
MSK: Mitogen or Stress activated Kinase
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF: Nerve Growth Factor
NHEJ: Non-Homologous End Joining system
NICD: Notch Intracellular Cytoplasmic Domain
NLK: Nemo-Like Kinase
NK: cellule Natural Killer
Nor1: Neuron-derived orphan receptor 1
PARP-2: Poly (ADP-ribose) Polymerase family 2
PCR: Polymerase Chain Reaction
PRAK ou MK5: p38 Regulated/Activated Kinase
PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
RAG-1/2: Recombination Activating Gene protein 1/2
RBPJ: Recombination site Binding Protein J
RCT: Récepteur de Cellule T
RH: Recombinaison Homologue
RSS: Recombination Signal Sequences
ROTC: Re-aggregated fetal Thymic Organ Culture
SAPK: Stress-Activated Protein Kinases
SCF-R: Stem Cell Factor Receptor
SP: Simple Positif
S1P₁: Sphingosine-1-Phosphate receptor 1
TAK1: TGF- β -Activated Kinase 1
TCF: T-Cell Factor
TEC: Thymic Epithelial Cells
TGF- β : Tumor Growth Factor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRA: Tissue-Restricted self Antigen

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Dr Nathalie Labrecque pour avoir cru en moi, pour m'avoir poussée à me surpasser et aussi pour m'avoir fait confiance pendant ces cinq années. Aussi, je te remercie Nathalie pour nos discussions sur le projet ERK3 dans ton chic bureau, pour tous tes conseils techniques et ton aide pour les présentations, ainsi que pour nos enrichissants et productifs débats lorsqu'on n'arrivait pas à la même conclusion sur mes résultats.

Merci également aux membres de mon jury, Dr Perreault, Dr Gounari et Dr Möröy, pour avoir accepté de faire parti de mon jury de soutenance de thèse.

Je veux aussi remercier le Dr Sylvain Meloche pour nous avoir offert la souris ERK3 ainsi que tous les autres modèles animaux étudiés dans cette thèse et aussi pour la révision attentive de mes articles de thèse. De plus, j'aimerais remercier les personnes de son laboratoire avec qui j'ai collaboré durant ma thèse : Benjamin Turgeon, Justine Rousseau et Kim Lévesque.

Je remercie aussi tous mes amis du labo 9-10, passés et présents, pour les discussions, l'aide et les folies passagères : Julie Leignadier, Julie Rooney, Marie-Pierre Hardy, Julie Leboeuf, Marilyne Cloutier et Marc-André Benoit. Un gros merci aussi à nos deux supers techniciennes animalières : Mélanie Lavoie et Julie Dubeau.

J'ai investi cinq années dans cette thèse et malgré toute la volonté et l'entêtement qui m'habitent (ceux qui me connaissent bien savent de quoi je parle), je ne me serais jamais rendue jusqu'au bout sans l'appui inconditionnel de mes parents, Lise et Gaétan, de ma sœur Chantale ainsi que de ma partenaire de labo et amie Julie. Vous m'avez toujours soutenue et encouragée et je vous en suis éternellement reconnaissante.

Je tiens sincèrement à remercier mon conjoint Alexandre, avec qui j'ai l'immense privilège de partager ma vie et qui m'encourage toujours avec enthousiasme à suivre la voie que j'ai

choisie. Finalement, je remercie mes très chers amis de toujours Kathryn, Claude et Bruce et un merci tout particulier à Yanic, pour les nombreuses fins de semaines de fête qui ont su apaiser les journées difficiles.

Avant-propos

Le monde de la signalisation intracellulaire pourrait être défini en quelques mots comme étant très vaste, diversifié, complexe, parfois contradictoire et multidisciplinaire. En effet, chaque molécule qui réside à l'intérieur de la cellule eucaryote est le sujet d'une histoire complexe dans laquelle on retrouve des partenaires, des inhibiteurs, des activateurs et des substrats qui font des interactions spécifiques et épisodiques les uns avec les autres. Chacune de ces molécules trouve sa place au sein de la cellule et souvent cette place est importante, voire vitale.

Comprendre les interactions moléculaires qui se font à l'intérieur d'un lymphocyte T pendant son développement ainsi qu'identifier les voies de signalisation activées chez ce dernier suite à la reconnaissance antigénique demeure un sujet d'actualité en immunologie en raison des nombreuses maladies, infections et dysfonctions qui surviennent lorsque ces acteurs essentiels de la réponse immunitaire sont altérés ou dénaturés.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'étudier une famille de molécules intracellulaire très célèbre : celle des MAP kinases. De plus, l'aspect multidisciplinaire prend tous son sens ici, puisque cette étude a été réalisée dans un contexte immunologique, celui de la biologie du lymphocyte T. Plus précisément, mon rôle d'étudiante au doctorat ne s'est pas limité à bonifier les connaissances actuelles sur le rôle des MAPK conventionnelles, mais plutôt d'agir en tant que pionnière pour comprendre la fonction physiologique de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans le développement et l'activation des lymphocytes T. Ce mandat, qui m'a été attribué pour ma thèse ne s'est pas révélé sans embûche puisque pour cette MAPK atypique, presque rien n'est connu à ce jour.

L'introduction de cette thèse est divisée en deux parties principales. Dans la première partie, je présente tous les membres de la grande famille des MAPK et la section des MAPK non-conventionnelles est beaucoup plus détaillée que celle des MAPK conventionnelles. Puisqu'au départ de cette thèse nous n'avions aucune idée si et où ERK3

allait intervenir au cours du développement thymique et/ou dans l'activation des LT, la deuxième partie consiste en une présentation complète et détaillée de la vie d'un LT. Cette section est divisée en deux sous-sections : le développement des LT et la biologie des LT périphériques et dans chacune, le rôle des différents membres de la famille des MAPK impliqués est présenté. Par la suite, deux articles qui seront soumis sous-peu sont présentés et finalement, une discussion alimentée d'hypothèses, de questions et de perspectives termine cette thèse.

Introduction

1. MAP Kinases

1.1 Généralités

Les voies de signalisation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) font parties des mécanismes de signalisation intracellulaire les plus omniprésents impliqués dans la régulation des cellules eucaryotes. Ces voies sont activées par de nombreux stimuli (cytokines, mitogènes, facteurs de différenciation, signaux de stress, inflammation) et elles régulent de manière coordonnée l'embryogenèse, la différenciation, la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation cellulaire, la mort, etc [1].

Chez les mammifères, il existe plus d'une douzaine de gènes codant pour les MAPK qui peuvent être classés en 7 voies de signalisation. Récemment, un modèle de classement des MAPK a été proposé en utilisant trois critères : structure, capacité de phosphorylation et activation par les kinases en amont (Figure 1) [2]. Ce modèle permet de ségréger les MAPK en deux groupes distincts : les MAPK conventionnelles et les MAPK non-conventionnelles.

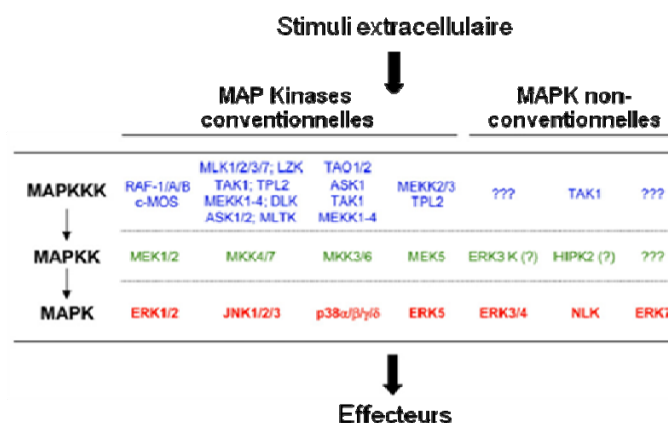


Figure 1: Voies de signalisation des MAPK chez les mammifères.
Adapté de [2].

1.2 Les MAPK conventionnelles

1.2.1 Propriétés générales et régulation des MAPK conventionnelles

Bien que chaque MAPK possède des caractéristiques uniques, plusieurs traits sont partagés par toutes les MAPK conventionnelles, dont les principaux représentants sont ERK1/2, JNK1/2/3, SAPK $\alpha/\beta/\gamma$, les kinases p38 et ERK5. Notamment, chacune possède un motif conservé composé d'une thréonine, d'un acide aminé qui varie selon chaque type de MAPK et d'une tyrosine (Thr-Xaa-Tyr) dans sa boucle d'activation. Ce motif est essentiel, car il permet à chaque MAPK d'être reconnue spécifiquement par sa kinase activatrice et ceci assure une réponse adaptée à la stimulation extracellulaire de la part de la cellule. De plus, chacune de ces MAPK est activée par une cascade de protéines kinases qui contient au moins deux kinases en amont (Figure 2).

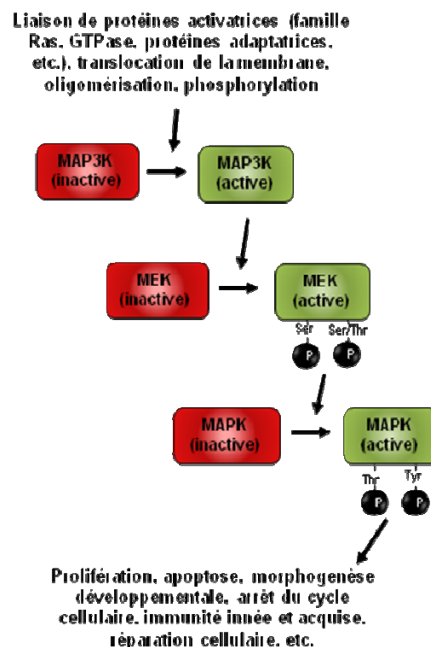


Figure 2: Cascade de signalisation générale des MAPK conventionnelles.

Adapté de [3].

Les kinases immédiatement au-dessus des MAPK sont des membres de la famille MAPK/ERK kinase ou MEK. Ces dernières doivent phosphoryler la tyrosine et la thréonine de chaque MAPK pour que cette dernière devienne totalement activée (Figure 2) [4, 5]. Chaque MAPK activée va phosphoryler à son tour de nombreux substrats (facteurs de transcription, diverses protéines kinases, des phospholipases et différentes protéines associées au cytosquelette) qui seront nécessaires pour que la cellule réagisse efficacement aux exigences de son environnement. De plus, les voies de signalisation des MAPK conventionnelles sont phylogéniquement conservées de la plante au mammifère [6]. Malgré toutes ces similarités, une différence majeure permet de séparer les MAPK conventionnelles en 2 groupes : la nature du stimulus. En effet, les MAPK ERK1 et ERK2 répondent préférentiellement aux mitogènes, alors que les kinases JNK/SAPK et les kinases p38 sont activées lors de situations de stress et d'inflammation. ERK5 est une exception car elle est activée autant par des facteurs de croissance que par des stress cellulaires [7]. Finalement, une fois qu'elles ont accompli leur fonction, les MAPK sont inactivées par trois groupes de phosphatases (MKP) : le premier groupe retire les phosphates des sérines/thréonines des MAPK, le second retire uniquement les phosphates des tyrosines et le troisième agit sur les deux résidus phosphorylés à la fois [8].

1.2.2 Les MAPK activées par les mitogènes

Voilà déjà presque 20 ans que ERK1 et ERK2 (ERK1/2) ont été identifiées comme des kinases stimulées par des facteurs de croissance et dont la fonction est de phosphoryler la protéine-2 associée aux microtubules (MAP2) ainsi que la protéine basique de la myéline (MBP) [9, 10].

ERK1/2 sont des protéines de 43 et 41 kDa respectivement, sont à 88% identiques et elles sont exprimées de façon ubiquitaire avec des abondances relatives variables selon les tissus [11]. Plusieurs stimuli activent la voie ERK1/2 tels que les facteurs de croissance, les interactions avec le récepteur des lymphocytes T (RCT), le sérum, les esters phorbols, les

cytokines, la dépolymérisation des microtubules et les stress osmotiques [11]. Au niveau structural, la thréonine et la tyrosine à l'intérieur de leur boucle d'activation sont séparées par un acide glutamique pour former le motif Thr-Glu-Tyr [11]. Une fois phosphorylés par c-Raf, MEK1/MEK2 vont activer les deux sites de phosphorylation de ERK1/2 qui migreront alors au noyau (Figure 3) [12]. Ceci aura comme conséquence directe la phosphorylation d'une multitude de substrats différents (la kinase ribosomale S6, les MSK, les MNK et des facteurs de transcription : Elk-1, c-Fos c-Myc, Ets, etc.) qui sont requis, entre autre, pour la progression de la phase G₁ à S du cycle cellulaire, pour le développement embryonnaire, la motilité cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire [13-15].

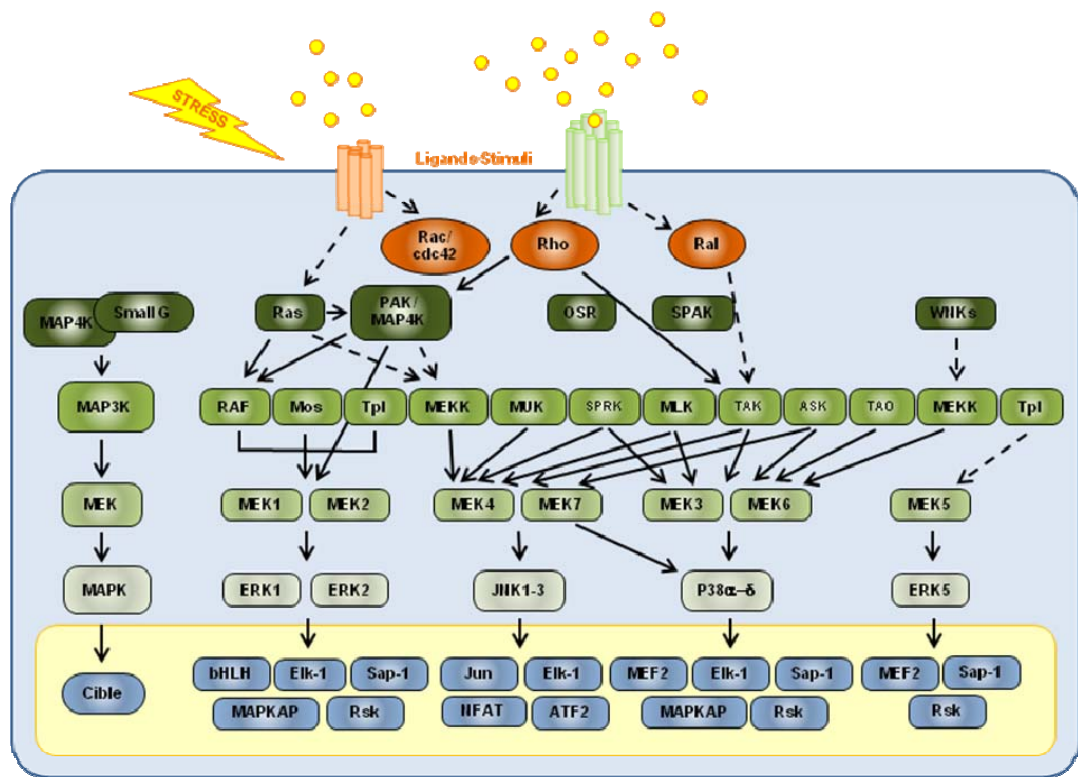


Figure 3: Schématisation de la signalisation des MAPK conventionnelles.

Les différentes voies de signalisation des MAPK conventionnelles sont activées préférentiellement selon le type de stimuli. Une fois activées, les MAPK vont migrer au noyau où elles vont activer les facteurs de transcriptions nécessaires aux réponses de la cellule à son environnement. Adapté de [12].

La différence majeure entre ERK1 et ERK2 est le résultat *in vivo* de leur abolition individuelle chez la souris. En effet, la souris ERK1-déficiente naît sans aucune malformation et se reproduit normalement, alors que l'abolition de *Erk2* entraîne une mort *in utero* résultant d'une malformation du trophoblaste [16, 17]. Aussi, la voie ERK1/2 doit être rigoureusement contrôlée, car le dérèglement d'un seul membre de cette voie peut entraîner des conséquences désastreuses. Par exemple, l'expression anormalement élevée de MEK1 ou encore certaines mutations au niveau de Ras ont été observées dans de nombreux cas de cancers humains tels que le cancer du sein, du poumon, du colon, du pancréas, de la prostate et du rein [18, 19]. De plus, plusieurs autres maladies sont suspectées d'être la conséquence d'un dérèglement de cette voie de signalisation, par exemple la maladie rénale polycystique, le diabète et certaines malformations comme le syndrome cardio-facio-cutané [20-23].

1.2.3 Les MAPK activées par les stress et l'inflammation

1.2.3.1 Les kinases JNK/SAPK

L'injection de cycloheximide chez le rat a permis à l'équipe d'Avruch d'identifier la kinase JNK qui fut alors nommée p54 en raison de son poids moléculaire [24, 25]. Presque au même moment, il a été démontré que p54 phosphoryle le facteur de transcription c-Jun à deux endroits impliqués dans la régulation des fonctions trans-activatrices de AP-1 et de c-Jun lui-même [26]. Ensuite, plusieurs études ont permis de démontrer que p54 n'est pas activé par les mitogènes, mais plutôt par les cytokines inflammatoires de la famille TNF, ainsi que par une variété de stress environnementaux tels que le choc thermique, les radiations ionisantes, les stress oxydatifs, les agents chimiques qui causent des dommages à l'ADN (inhibiteurs de topoisomérase et agents alkylants) et les inhibiteurs de synthèse protéique [27-33]. Plus tard, p54 fut rebaptisée, entre autre, en raison de la découverte de différents isoformes protéiques. Deux systèmes de nomenclature sont actuellement utilisés :

les protéines kinases activées par les stress (SAPK) pour faire référence à l'activation de ces kinases par les stress environnementaux/inflammation et les kinases c-Jun NH₂-terminales (JNK) parce que ces kinases phosphorylent le domaine trans-activateur de c-Jun.

Trois gènes codent les différents isoformes JNK/SAPK : *Jnk1/Sapkb*, *Jnk2/Sapka* et *Jnk3/Sapkg*. *Jnk1* et *Jnk2* sont ubiquitaires, alors que *Jnk3* est presque uniquement retrouvé dans le cerveau, le cœur et les testicules [34]. Leurs protéines sont identiques à plus de 85% et elles ont un poids moléculaire qui varient entre 46 et 55 kDa [3]. Chacun des isoformes JNK contient le motif caractéristique Thr-Xxx-Tyr des MAPK conventionnelles et c'est une proline (Pro) qui est située entre la thréonine et la tyrosine. Deux protéines kinases spécifiques activent directement les kinases JNK, MEK4 et MEK7 [34]. De plus, sous certaines conditions, MEK7 peut aussi activer la voie p38 (Figure 3). Les kinases JNK phosphorylent d'importants facteurs transcription (c-Jun, ATF-2, p53, ELK-1 et NFAT) et ces derniers sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose [12]. Les kinases JNK sont aussi impliquées dans la production de cytokine, la réponse inflammatoire, l'apoptose programmée au cours du développement et celle induite par les stress, la réorganisation de l'actine et la transformation cellulaire [15]. Un élément intéressant à considérer ici et qui ajoute un niveau de complexité à la compréhension de la signalisation des MAPK, est que certaines voies de signalisation distinctes, comme par exemple celles de ERK1/2 et des kinases JNK, peuvent se partager un même substrat, mais pas dans le même objectif. Effectivement, tel que mentionné ci-haut, ERK1/2 phosphorylent c-Myc pour induire la prolifération cellulaire, alors qu'il a été aussi démontré que les kinases JNK phosphorylent aussi c-Myc, mais pour sa fonction pro-apoptotique [35].

Les trois loci *Jnk* ont été supprimés chez la souris. Individuellement et sur un fond génétique mixte, aucune de ces mutations est létale ou engendre des malformations observables. Toutefois, le double mutant *Jnk1*^{-/-}/*Jnk2*^{-/-} décède *in utero* à la suite d'un défaut de fermeture du tube neural [36, 37]. Aussi, l'absence de JNK3 rend les neurones des souris

Jnk3^{-/-} résistants à la mort par excitotoxicité [38]. La dérégulation des voies de signalisation des kinases JNK est en partie responsable de l'apparition de différentes maladies telles que la dégénération neuronale, l'inflammation chronique, certains cancers et la maladie d'Alzheimer [39].

1.2.3.2 Les kinases p38

C'est au cours de 1994 que p38 fut découverte et ce, dans trois contextes indépendants [40-42]. Dans un article publié dans *Science*, p38 fut identifiée comme une phospho-protéine tyrosine présente dans les extraits de macrophages stimulés avec du LPS, alors qu'un article dans *Cell* qualifia p38 de protéine qui stimule la kinase MAPKAP kinase-2 (MK2) via des stress cellulaires [40, 41]. Finalement, un article publié dans *Nature* identifia p38 comme la cible d'une drogue immunosuppressive/anti-inflammatoire, le pyridinyle imidazole [42]. Cette drogue inhibe la production d'interleukine-1 (IL-1) et de TNF chez des monocytes activés.

Depuis, quatre isoformes appelés p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ ont été découverts et ils sont de 42% à 47% identiques à ERK1/2 [43]. Malgré que tous ces isoformes partagent une glycine (Gly) au centre de leur motif conservé (Thr-Gly-Tyr), de nombreuses différences existe entre ces membres. En général, p38 α ressemble plus à p38 β (75% identiques) que p38 γ et δ (62% et 64% identiques à p38 α) [44]. Un autre exemple est que p38 α et β sont sensibles au pyridinyle imidazole, alors que les autres isoformes y sont résistants. En plus, p38 α et β partagent certains substrats tels que ATF-2 et MK2 et sont exprimés ubiquitairement, alors que p38 γ est exprimé préférentiellement au niveau du muscle squelettique et que p38 δ est surtout exprimé dans les poumons, les reins, les organes endocriniens et l'intestin grêle [43-45]. La voie des kinases p38 répond a plusieurs des stimuli qui activent la voie des kinases JNK et comme mentionné ci-haut, elle peut être activée par les mêmes MEK que les kinases JNK bien que cette voie possède aussi ses activateurs spécifiques : MEK3 et MEK6 (Figure 3). De plus, les kinases JNK et les isoformes p38 se partagent les mêmes

phosphatases [46]. Les substrats de la voie des kinases p38 sont nombreux et on y retrouve des facteurs de transcription (ATF-1/2, Elk-1, NF- κ B, Ets-1, p53, etc.), des protéines cytoplasmiques et du cytosquelette, des protéines kinases activées par des MAK kinases (MAPKAP kinase-2, PRAK/MK5), etc [47-56].

In vivo, seul *p38a* a été inactivé chez la souris [57, 58]. Deux phénotypes ont été observés et ils sont dépendants du fond génétique de cette dernière. Chez une souris C57BL/6, une déficience en *p38a* entraîne la mort *in utero* avant le jour 11 à cause d'une malformation placentaire, alors que sur un fond génétique mixte, les souris *p38a*^{-/-} décèdent plutôt d'une production insuffisante d'érythropoïétine [57, 58]. De plus, la voie p38 est aussi associée à l'ontogenèse de plusieurs des maladies énumérées ci-haut pour les kinases JNK.

1.2.4 ERK5

ERK5 fut identifiée par deux groupes indépendants. Le premier utilisa MEK5, l'activateur unique et direct de ERK5, comme appât dans la technique de criblage double-hybride (*two-hybrid screen*) et le second, opta pour une stratégie de PCR utilisant des amorces dégénérées pour cloner de nouvelles MAPK [59, 60]. ERK5 est aussi connu sous le nom de BMK1 pour *Big MAP Kinase 1*, à cause de son poids moléculaire qui est presque le double de celui des autres MAPK conventionnelles (~ 80 kDa) [59]. Sa structure est composée d'une portion N-terminale qui renferme le motif d'activation Thr-Glu-Gly qui lui confère 51% d'homologie avec ERK1/2 et d'une portion C-terminale de 400 acides aminés qui possède une capacité d'activation de la transcription, ce qui la rend unique parmi les MAPK conventionnelles. En effet, il a été démontré que l'ablation de cette région altère l'activation de la transcription de MEF2 et de certains membres de la famille AP-1 [61, 62].

Tel que mentionné plus haut, ERK5 est autant activée par les stress cellulaires qui activent les kinases JNK et les kinases p38 (stress oxydatifs, hyperosmolarité), que par les mitogènes qui activent ERK1/2 (sérum, NGF) [63-65]. De plus, cette MAPK phosphoryle

plusieurs substrats de ERK1/2 tels que MEF2, c-Myc et la kinase ribosomale S6 [66, 67]. Finalement, ERK5 est une MAPK essentielle, puisque trois différentes équipes ont reporté que la délétion de ERK5 chez la souris cause une altération sévère de l'angiogenèse causant la mort embryonnaire [68-70].

1.3 Les MAPK non-conventionnelles

1.3.1 Propriétés générales des MAPK non-conventionnelles

Le principal lien unissant tous les membres du groupe des MAPK non-conventionnelles est que ces dernières sont différentes des MAPK conventionnelles soit de par leur structure, leur mode de régulation et/ou encore de leur cascade d'activation (Figure 1) [2]. Néanmoins, il existe des MAPK non-conventionnelles qui partagent certaines irrégularités, telles que ERK3 et ERK4. Il est important de mentionner que les différences qui séparent les MAPK conventionnelles des non-conventionnelles sont souvent à l'origine de la difficulté que rencontre, encore aujourd'hui, plusieurs équipes de recherche qui tente de mieux les caractériser. À ce jour, 4 MAPK non-conventionnelles ont été identifiées : ERK3, ERK4, NLK et ERK7.

1.3.2 ERK3 et ERK4

1.3.2.1 Découverte et structure

C'est par l'utilisation d'une sonde dérivée de ERK1 que l'équipe de Boulton identifia et clona ERK3 chez le rat pour la toute première fois [71]. Par la suite, un homologue de ERK3 fut identifié chez l'humain [72, 73], puis chez la souris [74]. ERK4, à l'origine nommée p63^{mapk}, fut aussi découverte grâce à son homologie avec ERK1 lors d'expériences de clonages moléculaires [75]. Le poids moléculaire de ERK4 est environ 70

kDa et elle partage 73% de similitude avec ERK3 au niveau du domaine kinase, ce qui fait de ERK4 la MAPK la plus homologue à ERK3 qui elle, fait environ 100 kDa [2]. ERK3 et ERK4 sont respectivement 45% et 42% similaires à ERK1/2 dans le domaine kinase (Figure 4) [71, 73]. Contrairement aux MAPK conventionnelles, aucun homologue de ERK3 ni de ERK4 n'est retrouvé chez la levure et chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ceci qui pourrait indiquer que ces deux MAPK non-conventionnelles ont été ajoutées tardivement chez les métazoaires dans leur répertoire de signalisation intracellulaire.

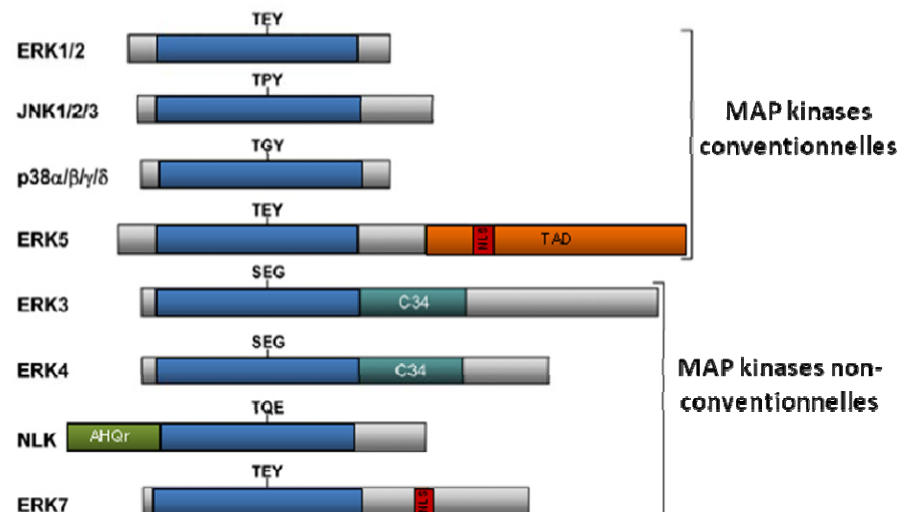


Figure 4: Schéma de la structure des MAP kinases mammifères.

La famille des MAPK peut être divisée en deux groupes : les MAPK conventionnelles et les MAPK non-conventionnelles. Chaque MAPK discutée dans ce travail de thèse est représentée ici. Bleu : domaine kinase; gris : extensions N- et C- terminales; TAD : domaine de transactivation; NLS : séquence de localisation nucléaire; C34 : région conservée chez ERK3 et ERK4; AHQr : domaine riche en alanine (A), histidine (H) et glutamine (Q). Le motif de phosphorylation retrouvé dans la boucle d'activation est représenté pour chaque kinase; Adapté de [2].

La structure est la première caractéristique qui positionne ERK3 et ERK4 dans la catégorie des MAPK non-conventionnelles. En effet, chacune de ces MAPK possède une extension C-terminale riche en Ser/Thr (Figure 4). Même si cette extension semble importante, car elle est conservée à travers l'évolution des vertébrés, sa fonction demeure encore inconnue. De plus, le motif en acide aminé à l'intérieur de la boucle d'activation de ERK3 et ERK4 n'est pas le motif conservé Thr-Xxx-Tyr, mais plutôt Ser-Glu-Gly [2]. Puisqu'il a été démontré que la double phosphorylation Tyr/Thr est essentielle à l'activation et à l'interaction de ERK1/2 avec leurs substrats spécifiques [76, 77], le remplacement de la tyrosine par une glycine chez ERK3 et ERK4 soulève certaines questions, telles que : de quelle façon ces MAPK sont activées et aussi, comment font-elles pour se lier à leurs substrats? Ces questions demeurent encore aujourd'hui sans réponse, en partie puisqu'aucun des membres connus de la famille des MEK est capable de phosphoryler et activer ERK3 ou ERK4 [78, 79].

1.3.2.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire

Le gène *Erk3* est exprimé dans une variété de tissus et de lignées cellulaires mammifères. Bien que des niveaux élevés d'ARNm de *Erk3* ait été observés au niveau du muscle squelettique, du cerveau et de l'intestin, *Erk3* est aussi exprimé dans le cœur, le placenta, le poumon, le foie, le rein, le tissu pancréatique et chez les fibroblastes humains de peau [73]. Pour sa part, l'expression de l'ARNm de *Erk4* est retrouvée principalement au niveau du colon, de l'œil, du cœur, du rein, du poumon, de l'ovaire, du pancréas, du placenta, de la prostate et de la peau et ce, avec les niveaux les plus élevés dans le cerveau [75, 80].

L'expression de ERK3 est régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. En effet, il a été observé que l'ARNm de *Erk3* augmente significativement au cours de la différenciation de la lignée de cellule embryonnaire de carcinome murin (P19) vers une lignée neuronale ou musculaire [71]. Il fut aussi démontré que l'expression de *Erk3* varie

en réponse à une molécule induisant une signalisation oncogénique appelée BRAF [81]. Malgré tout, la majorité des informations qui pourraient aider à comprendre comment *Erk3* est régulé sont inexistantes. De plus, rien n'est connu encore aujourd'hui à propos de la régulation de l'expression du gène *Erk4*.

Une autre différence entre ERK3 et les autres MAPK conventionnelles est sa régulation post-traductionnelle. Effectivement, il a été démontré en 2003 que ERK3 est une MAPK très instable et dont la demi-vie est d'environ 30 minutes dans les cellules en prolifération exponentielle [79]. Cette instabilité protéique est le résultat de la dégradation active de ERK3 par la voie ubiquitine-protéasome chez les cellules en prolifération [79]. Ce sont deux domaines de dégradation, situés dans sa partie N-terminale, qui sont essentiels et suffisants pour la poly-ubiquitination et la protéolyse de ERK3 via le protéasome 26S [79]. Corrélant avec ces résultats, il a aussi été montré que ERK3 s'accumule dans la cellule suivant l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome [82]. L'équipe de Meloche a aussi observé que ERK3 est stabilisé et s'accumule abondamment chez deux lignées cellulaires en différenciation (lignées cellulaires PC12 et C2C12) [79]. Contrairement à ERK3, ERK4 est une protéine assez stable, mais rien d'autre n'est connu sur la régulation de son activité protéique [83, 84].

ERK3 est située tant au niveau du cytoplasme que dans le noyau de différentes lignées cellulaires en prolifération [85-87]. De plus, il a été montré que sa localisation à l'intérieur de la cellule n'est pas affectée par les stimuli qui affectent normalement la relocalisation intracellulaire des MAPK conventionnelles [85]. Il semblerait que la situation soit différente pour ERK4, puisque cette dernière est majoritairement située dans le cytoplasme [2].

1.3.2.3 Activation, voie de signalisation et fonction

Il y a très peu d'informations actuellement au sujet de l'activation de ERK3 et de ERK4. Des études *in vitro* ont montré que la sérine 189 de ERK3 est phosphorylée dans de nombreuses lignées cellulaires, mais rien sur l'impact de cette phosphorylation n'a alors été mentionné [78, 79, 88]. Cette phosphorylation est constitutive, même chez les cellules privées de sérum et n'est pas augmentée suivant l'addition de facteurs de croissance. De plus, il s'agit d'une phosphorylation en trans, puisqu'il a été démontré qu'une version de ERK3 dans laquelle le domaine catalytique est inactivé, est phosphorylée de façon équivalente à la version originale de ERK3 [88]. Par conséquent, ERK3 répond différemment aux différents signaux comparativement aux MAPK conventionnelles. En 1996, une kinase contenue dans une fraction protéique de muscle de lapin, a été identifiée comme capable de phosphoryler la Ser 189 de ERK3 [78].

Actuellement, les voies de signalisation de ERK3 et de ERK4 sont encore inconnues (Figure 1). Tel que mentionné ci-haut, une kinase phosphorylant ERK3 a été découverte en plus d'être confirmée récemment, mais son identité demeure toujours inconnue [78, 89]. C'est en 2004 que MK5 fut identifié par deux équipes différentes comme un partenaire de ERK3 [86, 87]. Deux ans plus tard, MK5 fut aussi identifié comme partenaire de ERK4 et ce, par les mêmes équipes de recherche [83, 84]. MK5 fait partie de la famille des kinases PRAK (*p38 regulated/activated kinase*) de par son homologie avec MK2 et MK3 et les PRAK sont des substrats des MAPK. [90]. Par contre, MK5 n'est pas activée *in vivo* par les stimuli qui activent normalement la voie p38 et presque tout ce qui est connu au sujet de son activité est relié à ERK3 et ERK4 [91]. Entre autre, ERK3 et ERK4 ont la capacité de lier, de phosphoryler et d'activer MK5 et ceci est dépendant de la phosphorylation de la Ser189 et de la Ser186 dans la boucle d'activation de ERK3 et de ERK4, respectivement [83, 84, 86, 87, 89]. De plus, ERK3 et ERK4 doivent agir ensemble pour que MK5 soit complètement activée, puisque l'activité de cette dernière est réduite, mais pas abolie, dans

des fibroblastes murins ERK3-déficients [86]. Aussi, l'inactivation concomitante de *Erk3* et de *Erk4* à l'aide d'ARN interférents (siRNA) résulte en une réduction presque complète de l'activité de MK5 [83, 84, 86, 87]. Malgré tout, il est impossible de conclure que hiérarchiquement, ERK3 et ERK4 sont en amont de MK5, puisqu'il a aussi été montré, à l'aide de siRNA ciblant *Mk5* ou encore chez des fibroblastes MK5-déficients, que les niveaux protéiques de ERK3 sont fortement diminués suite à l'abolition de *Mk5* (Figure 5) [86, 87].

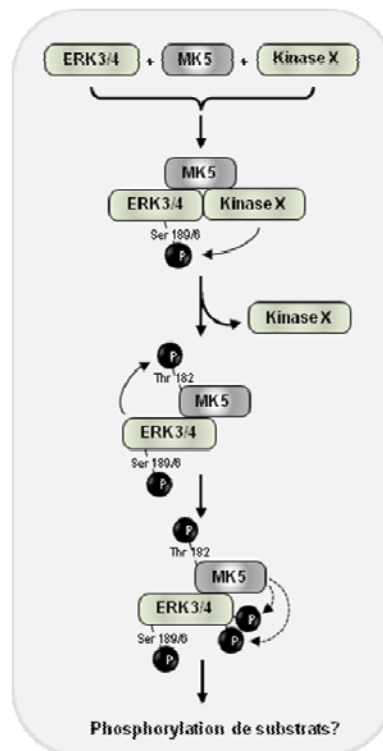


Figure 5: Modèle de l'activation des complexes ERK3/ERK4 - MK5

Ce modèle est basé sur différentes expériences et propose que MK5 interagit avec ERK3/ERK4 non-phosphorylées, mais que cette interaction est de faible affinité et transitoire [89]. Toutefois, cette interaction permet le recrutement d'une autre kinase non-identifiée (Kinase X) et/ou contribue à l'activation de ERK3/ERK4 par la kinase X qui phosphoryle leur Ser 189 et Ser 186, respectivement [89]. Ensuite, la Kinase X se dissocie du complexe qui est stabilisé par la phosphorylation de ERK3/ERK4 et ces dernières phosphorylent la Thr 182 de MK5 [83, 84, 86]. Alors, MK5 est pleinement activée et elle va pouvoir à son

tour phosphoryler ERK3/ERK4 à l'extérieur de leur boucle d'activation [83, 87]. Une fois activées, ERK3/ERK4 vont phosphoryler d'autres substrats et exercer leurs fonctions physiologiques. Adapté de [89].

Une autre information intéressante à mentionner est que MK5 phosphoryle directement le facteur de transcription p53 *in vitro* et *in vivo*, ce qui laisse suggérer que cette dernière pourrait participer au cours des périodes d'arrêt du cycle cellulaire [92]. Aussi, trois autres partenaires ont été identifiés *in vitro* pour ERK3 : la MAP2, la cycline D3 et Cdc14A [93-95]. L'équipe de Jensen a montré que ERK3 et Cdc14A interagissent ensemble, que l'expression de Cdc14A entraîne la migration de MK5 du noyau vers le cytoplasme et que tout ceci corrèle avec la stabilisation d'un complexe formé entre ERK3 et la cycline D3 [95]. A titre d'informations, la cycline D3 est une cycline régulatrice de la phase G₁ du cycle cellulaire nécessaire à l'entrée en phase S. Chez la levure Cdc14A est une phosphatase impliquée dans la sortie de la phase mitotique, dans la réplication de l'ADN et en plus, sa surexpression cause un arrêt en G₁ [96, 97]. Des expériences supplémentaires seront requises afin de révéler l'importance réelle que pourrait avoir ces 4 partenaires sur la voie de signalisation de ERK3.

Tel que mentionné plus haut, ERK3 s'accumule autant sous la forme d'ARNm que de protéines dans les cellules différenciées suggérant un rôle potentiel pour ERK3 en tant que régulateur négatif de la progression du cycle cellulaire et ce, dans le but ultime de faciliter les processus de différenciation cellulaire. De plus, quelques études *in vitro* appuient cette hypothèse puisqu'elles ont toutes démontré que la surexpression de ERK3 dans certaines lignées cellulaires inhibe l'entrée en phase S et donc bloque le cycle cellulaire en phase G₁ [79, 85, 98].

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour la fonction physiologique de ERK3 suite à différentes observations. Une de celles-ci est que cette MAPK pourrait être impliquée au cours du développement embryonnaire, puisque l'expression de son ARNm est augmentée entre les jours 9 à 11 de l'embryogenèse coïncidant avec l'organogenèse précoce chez la

souris [74]. Aussi, il a été proposé que ERK3 pourrait être impliquée dans la régulation de la sécrétion d'insuline et ce, suite à deux différentes observations. La première est que ses niveaux d'ARNm et de protéines augmentent suivant un traitement à la prolactine (inducteur de synthèse d'insuline) et la deuxième est que l'utilisation d'un siRNA ciblant *Erk3* abolie la sécrétion d'insuline dans les îlots pancréatiques du rat [93, 99]. Le modèle de souris ERK3-déficient existe, mais son phénotype n'a pas encore été publié (Turgeon et al. soumis). Puisque les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués à l'aide de ce modèle animal, il nous est possible de mentionner que la souris *Erk3*^{-/-} naît normalement, mais décède environ une heure suivant sa naissance de multiples altérations physiologiques qui originent d'un retard de croissance intra-utérin (Turgeon et al. Soumis). Ce sujet ne sera pas discuté plus en détail dans la présente thèse par respect des auteurs initiaux de la souris *Erk3*^{-/-} et aussi puisque les différents phénotypes conduisant à la mort de la souris *Erk3*^{-/-} n'ont pas de conséquence sur ce que nous avons observés dans ce projet (confirmé dans l'article proposé 1). Encore aujourd'hui, rien n'est connu concernant la fonction physiologique de ERK4. Finalement, bien que MK5 ait été identifié comme partenaire de ERK3 et de ERK4, cette découverte n'entraîne pas plus d'informations sur le rôle de ces molécules puisque la fonction physiologique de MK5 demeure indéterminée [100].

1.3.3 NLK

1.3.3.1 Découverte et structure

C'est en 1994 que Choi et Benzer décrivirent une nouvelle mutation chez *Drosophila melanogaster* qu'ils surnommèrent *nemo* (*nmo*) [101]. Chez *D. melanogaster*, cette mutation a comme conséquence une réduction de la viabilité et aussi une rotation incomplète des cellules photoréceptrices de l'œil. Les auteurs ont aussi mentionné que, par sa séquence en acide aminé, *nmo* code pour une kinase Ser/Thr très similaire aux MAPK, mais qu'elle partage aussi certaines ressemblances avec les kinases cycline-dépendantes

(Cdk) qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle cellulaire [101]. NLK est un homologue de *nmo* et fut identifiée chez la souris en 1998 par la technique de PCR utilisant des amorces dégénérées [102]. Un homologue de NLK, appelé LIT-1 existe aussi chez *C. elegans* [103].

NLK est 45% identique à ERK1/2 et parmi les Cdk, sa plus forte homologie est avec Cdk2 (38% dans le domaine kinase) [102]. Malgré cette homologie, NLK ne possède pas le motif caractéristique des MAPK conventionnelles dans sa boucle d'activation, mais plutôt la séquence tyrosine-glutamine-acide glutamique (Thr-Gln-Glu) qui ressemble plus à la séquence Tyr-His-Glu de Cdk2 [104]. De plus, NLK possède une longue région N-terminale riche en alanine, glutamine et histidine dont la fonction est inconnue (Figure 4) [102].

1.3.3.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire

L'ARNm de *Nlk* est exprimé ubiquitairement avec des niveaux plus élevés dans le cerveau [102]. Aucune information n'est disponible actuellement concernant la régulation du gène *Nlk* et de sa protéine et la localisation intracellulaire de NLK n'est pas très bien définie.

1.3.3.3 Activation, voie de signalisation et fonction

Il a été démontré *in vitro* que la substitution de la Thr 286 de NLK par un acide aspartique ou un acide glutamique empêche son activité d'autophosphorylation [102]. Par contre, depuis, aucune étude n'a confirmé que ce site pourrait être phosphorylé *in vivo*.

NLK est activé par de nombreux ligands extracellulaires tels que Wnt, l'IL-6, le G-CSF et le TGF- β [105-108]. Chez *C. elegans*, il a été démontré que LIT-1 (homologue de NLK) interagit avec la protéine MOM-4 pour réguler la signalisation Wnt durant l'embryogenèse

[103]. MOM-4 est l'homologue de TAK1, une MAP3K, chez les mammifères [109]. En 1999, l'équipe de Matsumoto démontra que TAK1 est bien la MAP3K de NLK et que toutes deux sont impliquées dans la régulation négative de la signalisation Wnt [110]. En effet, NKL possède la capacité de phosphoryler directement les membres de la famille TCF/LEF [110, 111]. De plus, NLK agit aussi comme suppresseur du facteur de transcription NF- κ B [112].

In vivo, en plus de jouer des rôles essentiels dans le développement de *D. melanogaster* et de *C. elegans*, il a été démontré chez la souris que la suppression de *Nlk* génère un phénotype assez complexe dépendant du fond génétique [113]. En effet, sur un fond C57BL/6, les embryons *Nlk*^{-/-} meurent tardivement *in utero* d'une cause inexplicée, alors que sur un fond génétique 129/sv, les souris *Nlk*^{-/-} survivent jusqu'à environ 6 semaines, mais ont un retard de croissance et souffrent de problèmes neurologiques [113]. Au niveau histologique, les souris *Nlk*^{-/-} ont une différenciation aberrante des cellules du stroma de la moelle osseuse et un système hématopoïétique altéré (50% moins de cellules totales dans la moelle osseuse et une réduction cellulaire plus sévère chez la lignée lymphoïde que myéloïde) [113]. Dans le même article, les auteurs ont créé des chimères hématopoïétiques *Nlk*^{-/-} et aucun des phénotypes précédents ne fut alors observé [113]. Par conséquent, les auteurs ont conclu que la mutation *Nlk* chez la souris affecte directement la différenciation des cellules stromales de la moelle et ceci affecte indirectement le compartiment hématologique.

1.3.4 ERK7

1.3.4.1 Découverte et structure

Un ADNc encodant ERK7 a été isolé par l'équipe de Rosner en 1999 suite à la réalisation de PCR utilisant des amorces dégénérées basées sur les séquences des MAPK conventionnelles connues [114].

ERK7 est une protéine de 61 kDa qui partage 45% d'homologie avec ERK1/2 et elle possède aussi le même motif dans sa boucle d'activation que ERK1/2 (Thr-Glu-Tyr) [114]. Par contre, contrairement aux MAPK conventionnelles, ERK7 possède une extension C-terminale qui contient deux domaines de liaison SH3 et une hypothétique séquence de localisation nucléaire (NLS) (Figure 4) [114].

1.3.4.2 Expression, régulation et localisation intracellulaire

L'ARNm de *Erk7* est exprimée ubiquitairement et ses niveaux les plus élevés sont retrouvés dans le poumon et les testicules [114].

L'activité protéique de ERK7 est contrôlée par le système ubiquitine-protéasome [115]. En effet, ERK7 partage une similarité avec ERK3 puisque dans les cellules en prolifération exponentielle, ERK7 est aussi rapidement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome [115]. Par contre, sa demi-vie dans les cellules en prolifération est de 2 heures et le signal de dégradation est situé dans sa portion N-terminale [115].

Il a été montré que lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules CV-1, ERK7 localise au noyau où elle inhibe la synthèse d'ADN [114]. De plus, la délétion de son extension C-terminale cause sa relocalisation dans le cytoplasme. Malheureusement, la localisation intracellulaire de la protéine endogène est inconnue actuellement.

1.3.4.3 Activation, voie de signalisation et fonction

Tout comme il a été mentionné pour ERK3 plus haut, les stimuli qui activent les MAPK conventionnelles n'ont aucun effet sur l'activité de ERK7 [114]. Encore aujourd'hui, l'identité du ou des stimuli de ERK7 demeurent inconnus. Il a été montré que ERK7 est constitutivement phosphorylée sur son motif Thr-Glu-Tyr *in vivo* [114]. De plus, l'expression dans *Escherichia coli* d'une forme recombinante de ERK7 est aussi phosphorylée sur ses résidus Tyr et Thr, ce qui suggère que ERK7 possède la capacité de

s'autophosphoryler [116]. Aussi, l'ablation du domaine C-terminal de ERK7 cause une réduction de l'activation de cette MAPK [114]. Actuellement, la voie de signalisation de ERK7 demeure inconnue.

ERK7 phosphoryle plusieurs facteurs de transcription *in vitro* tels que c-Fos et c-Myc [114]. Par contre ERK7 ne phosphoryle pas les mêmes résidus sur ces molécules que ERK1/2. Par exemple, ERK7 phosphoryle la Ser 126 et la Thr 94 de MBP tandis que ERK1/2 phosphoryle la Thr 97 [117, 118]. De plus, en utilisant la partie C-terminale de ERK7 comme appât dans la technique de criblage double-hybride, un nouveau partenaire de ERK7, CLIC3, a été identifié [119]. CLIC3 fait partie de la famille des *chloride channel-related protein*, ce qui pourrait indiquer que ERK7 aurait un rôle à jouer dans le transport du chlorure. Aussi, l'activité inhibitrice de synthèse d'ADN mentionnée plus haut laisse suggérer que ERK7 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Malgré tout, les substrats et la fonction physiologique de ERK7 demeurent inconnus.

2. Le développement intrathymique des lymphocytes T

C'est dans les années 60 que J.F.A.P. Miller fit la découverte colossale que le thymus est responsable de la production d'un groupe de petits lymphocytes recirculants, nommés lymphocytes T (LT), qui initient la réponse immunitaire cellulaire et facilitent la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB) [120, 121]. Le développement des LT est unique comparativement à celui des autres lignées hématopoïétiques puisqu'il se produit entièrement à l'intérieur du thymus [122]. De plus, un autre phénomène essentiel est associé au thymus : celui de la communication bilatérale (*thymic crosstalk*). Effectivement, plusieurs études ont montré que d'une part les cellules stromales thymiques ont besoin d'interagir constamment avec les thymocytes afin qu'elles se développent et maintiennent

leur intégrité, et que d'autre part les thymocytes dépendent aussi de ces interactions afin qu'ils se différencient correctement [123-126].

Anatomiquement et fonctionnellement, le thymus peut être divisé en différentes régions. Il est composé d'un cortex dense contenant une multitude de thymocytes immatures entassés et d'une médulla plus clairsemée, car à cet endroit sont retrouvés les thymocytes les plus matures qui y sont moins nombreux. Le cortex est l'endroit du développement précoce, de l'acquisition d'un récepteur de cellule T (RCT) et de la sélection positive, alors que la médulla est le site de la sélection négative pour les thymocytes simple-positifs (SP) auto-réactifs [127]. Tel que schématisé dans la figure 7, le développement thymique débute avec l'entrée des progéniteurs lymphoïdes dans le thymus qui vont rapidement entrer en division cellulaire et ce pour les deux premières étapes (étapes double-négatif 1 (DN1) et DN2). Ensuite, à l'étape DN3, les thymocytes vont arrêter de proliférer pour réarranger le locus β du RCT. Le réarrangement fonctionnel de la chaîne bêta du RCT permettra aux DN3 d'exprimer à leur surface un pré-RCT et par conséquent de recevoir les signaux nécessaires à leur survie, leur prolifération et leur différenciation vers l'étape DN4. Après une phase de prolifération massive à l'étape DN4, les thymocytes cesseront à nouveau de proliférer afin de devenir une cellule double-positive (DP) et réarranger le locus α du RCT. Finalement, les DP vont tester leur nouveau RCT lors des sélections thymiques et ensuite ils vont poursuivre leur différenciation afin de devenir des thymocytes SP matures exprimant un RCT fonctionnel, utile et non-autoréactif. Dans la prochaine section, tous les détails concernant les différentes étapes du développement intrathymique seront présentés.

2.1 L'origine et le développement précoce des lymphocytes T

2.1.1 De la cellule souche hématopoïétique au progéniteur T précoce

Chaque cellule du système hématopoïétique se développe à partir d'un précurseur commun appelé cellule souche hématopoïétique (CSH). Une CSH est définie par sa capacité d'auto renouvellement et sa pluripotence dans la production de cellules matures et est retrouvée principalement dans le foie fœtal ou dans la moelle osseuse chez l'adulte. Bien qu'il soit un organe spécialisé dans la génération de LT immunocompétents, le thymus n'est pas un endroit favorable au maintien de cellules souches capables de s'auto renouveler et doit périodiquement être alimenté en progéniteurs provenant de la moelle par l'intermédiaire de la circulation sanguine [128, 129]. L'identité exacte de la cellule progénitrice qui s'établit dans le thymus via la circulation sanguine n'est pas encore définie. Toutefois, il existe actuellement plusieurs progéniteurs candidats et ces derniers incluent les CSH elles-mêmes ainsi que d'autres progéniteurs qui ont perdu la capacité de s'auto-renouveler et qui ont entrepris différents degrés de différenciation vers la lignée des LT (Figure 6) [130]. L'entrée des progéniteurs dans le thymus n'est pas un phénomène passif et continu puisqu'il a été démontré que ce phénomène est plutôt épisodique et que le thymus est plus souvent réfractaire (3 semaines sur 4) que réceptif (1 semaine sur 4) à l'entrée de progéniteurs [131-133]. Ceci s'explique par le fait qu'il n'y a qu'un nombre limité de niches disponibles dans le thymus et qu'une fois qu'elles sont remplies, ce dernier redeviendra permissif à l'entrée de nouveaux progéniteurs qu'une fois les progéniteurs T occupants évacués. De plus, il a été estimé que le taux de remplacement des précurseurs thymiques dans un thymus adulte est d'environ 2 à 3 % par jour [134].

Plusieurs molécules impliquées dans la migration des progéniteurs à l'intérieur du thymus ont été identifiées. Une de ces molécules est le récepteur de chimiokine CCR9 qui est exprimé à la surface de certains thymocytes (Figure 6) [135]. Effectivement, il a été démontré par une expérience de greffe que les cellules de moelle de souris CCR9-déficientes mises en compétition avec les même cellules provenant d'une souris normale sont très peu efficaces à repeupler le thymus d'une souris irradiée de façon létale [136]. CD44 est aussi une molécule importante pour l'entrée des progéniteurs thymiques, car il a

été entre autre montré que l'injection intraveineuse de progéniteurs extraits de la moelle pré-incubés avec l'anticorps anti-CD44 entraîne une faible repopulation thymique chez la souris, alors que les mêmes cellules pré-traitées injectée intrathymiquement sont capables de repeupler un thymus murin [137]. D'autres molécules ont aussi été identifiées comme jouant des rôles importants dans le phénomène d'entrée thymique, par exemple la molécule d'adhésion PSGL-1 et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Figure 6) [138, 139].

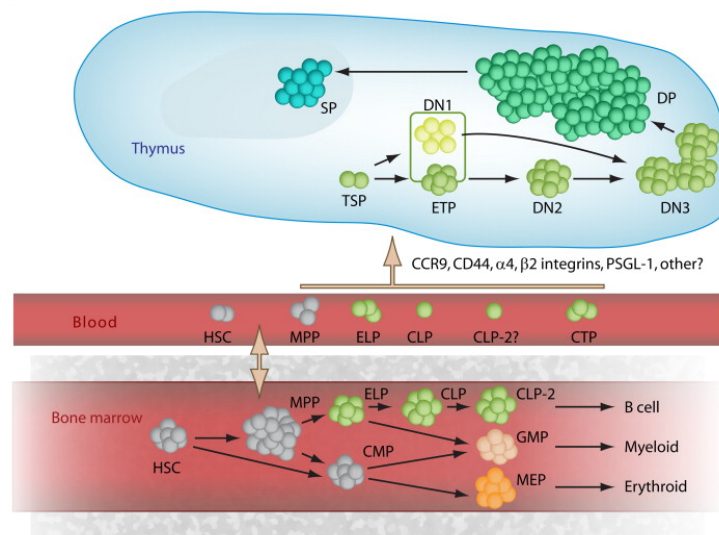


Figure 6: Hétérogénéité et entrée thymique des progéniteurs T

Dans la moelle osseuse, les CSH donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP). Un sous-groupe de MPP est appelé précurseurs lymphoïdes précoces (*early lymphoid progenitors* ou ELP). Les progéniteurs subséquents incluent les progéniteurs lymphoïdes communs (*common lymphoid progenitors* ou CLP) qui sont aussi à l'origine des LB. La plupart de ces cellules sont aussi présentes dans le sang. De plus, on retrouve dans la circulation sanguine les progéniteurs T circulants (*circulating T cell progenitors* ou CTP). Seules les cellules exprimant les molécules d'adhésion et les récepteurs aux chimiokines appropriés (CCR9, CD44, intégrines $\alpha 4\beta 2$, PSGL-1, etc.) accèdent au thymus et ces dernières constituent les progéniteurs thymiques « colonisateurs » (*thymus-settling progenitors* ou TSP). Cette population cellulaire est assez hétérogène dans son état de différenciation ainsi que dans ses capacités et elle est à l'origine des LT immunocompétents. CMP : progéniteurs communs myéloïdes; DN : thymocytes doubles négatifs; DP : thymocytes doubles positifs; ETP : progéniteurs T précoces; GMP : progéniteurs granulocytes/monocytes; MEP : progéniteurs megakaryocytes/erythrocytes; MMP : progéniteurs multipotents; SP : thymocytes simples positifs. Extrait de [130].

Phénotypiquement, le groupe de cellules le plus immature dans le thymus est caractérisé principalement par l'absence d'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Ce dernier est assez hétérogène et est constitué de thymocytes surnommés doubles-négatifs (DN). De plus, les DN représentent moins de 5% des thymocytes totaux et sont aussi caractérisés par une faible expression de plusieurs marqueurs de cellules différenciées qui sont regroupés sous le nom de marqueurs Lin (*lineage*) [140, 141]. Ce groupe comprend les marqueurs phénotypiques suivants : NK1.1 (cellules NK), B220 (LB), Gr-1 (granulocytes), Mac-1 (cellules macro-monocytaires), CD11c (cellules dendritiques ou DC), RCT β , RCT $\gamma\delta$, CD8 et CD3 ϵ (LT) et finalement TER119 (lignée érythrocytaire). De plus, sur la base de l'expression différentielle de CD44 (p g p-1) et de CD25 (récepteur α de l'interleukine-2 ou IL-2R α), les DN peuvent être subdivisés en 4 groupes : DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44^{+/fort}), DN3 (CD25⁺CD44^{-/faible}) et DN4 (CD25⁻CD44⁻) [142]. Les précurseurs des thymocytes les plus immatures font partis du groupe DN1 (Figure 6). Depuis quelques années, la définition au sens stricte de thymocyte DN1 est devenue inadaptée avec l'identification, dans ce groupe, de progéniteurs ayant le potentiel de se différencier en LB, LT, DC, cellules myéloïdes et en cellule NK (Figure 7) [143-147]. Aussi, même les progéniteurs les plus immatures de LT identifiés, appelés progéniteurs T précoces (ETP), ne possèdent pas le phénotype typique des DN1 puisque la plupart des ETP expriment des niveaux considérables de CD4 [148-150]. Phénotypiquement, les ETP sont principalement caractérisés par une faible expression des marqueurs Lin et ils sont aussi CD25⁻ et c-Kit^{fort} (récepteur du facteur de croissance des cellules souches ou SCF-R) [148, 151]. Dans le thymus d'une jeune souris il y a environ 1 ETP pour 10x10⁴ thymocytes [152]. Aussi, chaque ETP possède la capacité de générer environ 10 000 LT [151]. Par conséquent, un thymus de 150 000 000 cellules contiendra 15 000 ETP.

Les précurseurs multipotents accèdent au thymus via les vaisseaux situés près de la jonction corticomédullaire. La différenciation des LT nécessite une migration de la cellule à travers le thymus afin de que cette dernière rencontre successivement tous les micro-environnements favorables à l'avènement de sa différenciation en LT immunocompétent. Les flèches pointillées représentent les voies alternatives de développement que la cellule peut prendre pour se différencier en un autre type cellulaire qu'un LT. DN : thymocytes doubles négatifs; DP : thymocytes doubles positifs; ETP : progéniteur T précoce; ISP : simple positif immature; LMPP : progéniteur multipotent lymphoïde; NK : cellules NK; SP : thymocytes simples positifs; TCR : récepteur de cellule T. Adapté de [153].

En plus d'avoir le potentiel de se différencier en LT, les ETP peuvent aussi se différencier en NK et en DC, et cette capacité est conservée chez les DN2 et ce, jusqu'à ce que la cellule soit engagée définitivement vers la lignée T au stade DN3 [130, 152, 154]. De plus, il a été montré que certaines sous-populations d'ETP peuvent se différencier en cellules myéloïdes et en LB (Figure 7) [148, 151, 152, 155].

Il serait inapproprié d'aborder les étapes subséquentes du développement thymique sans mentionner les principaux acteurs nécessaires pour que les progéniteurs entrant dans le thymus se dirigent vers la lignée des LT. Six facteurs de transcription clés ont été identifiés comme étant requis pour le développement précoce des LT : Ikaros, GATA3, PU.1, c-Myb, le complexe RUNX1-CBF β et le facteur de transcription RBPJ activé par la voie Notch [156-169]. Sommairement, aucun développement T n'est observé chez les souris déficientes pour chacun de ces différents facteurs de transcription [158, 159, 162, 163, 165, 166, 168]. Par contre, une hiérarchie d'expression existe et elle est importante, car il a entre autre été démontré que la compétence des précurseurs à répondre à RBPJ et à s'engager vers la lignée T, dépend préalablement de l'expression d'Ikaros, de PU.1, de c-Myb et du complexe RUNX1-CBF β [170]. De plus, certains de ces facteurs de transcription sont également requis pour des étapes subséquentes du développement thymique. Par exemple, l'abolition conditionnelle de *Gata3* chez la souris après le stade DN1 entraîne un blocage de la β -sélection au stade DN3 [171].

2.1.2 Les premières étapes du développement intrathymique

2.1.2.1 Les étapes précoces RCT-indépendantes

Une fois qu'ils ont pénétré dans le thymus, les ETP vont demeurer environ 10 jours à la jonction corticomédullaire où ils vont recevoir différents signaux pour survivre et proliférer massivement et ce, afin qu'il y ait suffisamment de cellules disponibles pour auditionner aux rigoureuses sélections thymiques (Figure 7) [172, 173]. Un signal essentiel au développement précoce des LT est généré par l'interaction du récepteur Notch1 avec ses ligands Delta-like (DL). Cette interaction entraîne le clivage protéolytique et la libération du domaine intracellulaire cytoplasmique de Notch appelé NICD. Une fois libre, ce dernier migre au noyau et s'associe au facteur de transcription RBPJ, aussi connu sous le nom de CSL, qu'il convertit d'un répresseur en un activateur de la transcription [174]. Chez les

mammifères, quatre récepteurs Notch (Notch1 à 4) ont été identifiés comme interagissant avec deux classes de ligands transmembranaires appelés Jagged 1 et 2, et Delta-like 1, 3, et 4 [174]. Historiquement, DL1 a été identifié comme le ligand de Notch1, puisque son expression dans les cellules stromales OP9 permet *in vitro*, à partir de CSH, un développement complet de LT [175, 176]. Récemment, l'équipe de Radtke a remis en question cette affirmation en montrant que les cellules épithéliales thymiques (TEC) n'expriment pas DL1, mais plutôt DL4 et que la délétion conditionnelle de DL4 dans les TEC empêche le développement des LT *in vivo* [177, 178]. La nécessité de la signalisation Notch dans le développement thymique est aussi justifiée par la démonstration que la surexpression de NICD dans des progéniteurs résulte en un développement ectopique de LT dans la moelle osseuse de souris à la place de LB [179]. Aussi, à l'inverse, il a été démontré qu'une délétion conditionnelle de Notch1 chez la souris a comme conséquence une absence de développement T dans le thymus qui est plutôt remplacé par un développement B [180]. En plus des ligands de Notch, l'épithélium thymique exprime d'autres ligands et facteurs nécessaires au développement thymique précoce tels que le ligand SCF et l'IL-7 [181-183].

Après les 10 jours, les ETP vont commencer à exprimer le CD25, le CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7 ou IL-7R α) et les facteurs de transcription TCF1 et E2A qui sont essentiels pour la différenciation en DN2 [184, 185]. Alors que leur survie est assurée grâce à l'IL-7, qui dirige l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2, les DN2 prolifèrent massivement, perdent progressivement la capacité de se différencier en DC et en NK et migrent à travers le cortex (Figure 7) [172, 186, 187]. En migrant vers la région sous-capsulaire, la cellule transite vers le stade DN3 et l'expression des différents gènes requis pour l'engagement définitive vers la lignée T augmente tels que *Rag1*, *Rag2*, *pTa*, *CD3e*, *Lck* et *Tdt*) [188-192].

2.1.2.2 Les étapes précoces RCT-dépendantes

La transition DN2-DN3 s'achève avec la diminution de l'expression de CD44, l'activation de tous les gènes requis pour devenir une cellule T coïncidant avec la perte des potentiels de ne pas devenir une cellule T, et l'arrêt de la prolifération cellulaire [193]. Aussi, pendant ce temps, et jusqu'à ce la signalisation via le pré-RCT soit engagée, la survie, ainsi que la préservation du statut métabolique de la cellule (taille de la cellule, prise de glucose) dépendent de la signalisation Notch [194, 195]. Il a été démontré que l'arrêt de la prolifération cellulaire est principalement contrôlé par des facteurs de transcription de la famille des protéines E, E2A et HEB [196]. L'entrée en phase G₁ est nécessaire à cette étape pour permettre l'expression de la protéine RAG-2 qui est instable chez les cellules en division et aussi pour prévenir l'induction de cassures doubles brins (DSB) dans l'ADN chez les thymocytes plus immatures qui prolifèrent [197-199]. Une fois exprimée, RAG-2 pourra collaborer avec RAG-1 et initier le réarrangement somatique des gènes codant pour le pré-RCT ou pour le RCT $\gamma\delta$ [197]. Effectivement, c'est aussi à cette étape que certains DN3 vont adopter la lignée des LT RCT $\gamma\delta$ □ après avoir réarrangé productivement les gènes *Tcrg* et *Tcrd* et associer correctement les deux chaînes produites pour ensuite les exprimer en surface [200]. Le rôle précis des RAG-1/2 est de reconnaître et aligner les séquences signal de recombinaison (RSS) juxtaposées entre les segments V, D et J des gènes *Tcrb*, *Tcra*, *Tcrg* et *Tcrd* et en plus d'y créer des DSB à recombiner (Figure 8) [201]. Le résultat de ces cassures est la formation de deux extrémités codantes et de deux extrémités signal de recombinaison qui sont maintenues par les RAG-1/2 pour former un complexe synaptique post-clivage stable en préparation pour la phase de raccordement [201]. C'est la machinerie cellulaire de réparation des dommages à l'ADN (DSBR) qui reconnaît le complexe RAG-DSB et qui achève la réaction par la formation d'un signal de jonction et d'une jonction codante [201, 202]. Il existe deux mécanismes généraux de DSBR chez les cellules eucaryotes : le premier est le *nonhomologous end joining* (NHEJ) qui prédomine en phase G₁ et le second marque plutôt la transition S/G₂ et est la recombinaison homologue

(RH) [203]. Le NHEJ est essentiel à l'aboutissement de la recombinaison V(D)J et comprend plusieurs protéines ubiquitaires telles que Ku70, Ku80, Artémis, la sous-unité catalytique DNA-PKcs, XRCC4, et l'ADN ligase IV [204, 205]. Tel que schématisé dans la figure 8, le NHEJ débute avec les protéines Ku70-80 qui entourent les extrémités libres dans l'ADN, produites par l'activité des RAG et qui recrutent la DNA-PKcs, ce qui augmente l'activité kinase de la DNA-PK. Par la suite, Artémis sera recruté et phosphorylé et elle pourra alors ouvrir les extrémités et recruter XRCC4. Finalement, XRCC4 recrutera la DNA ligase IV ainsi que la Pol μ et cette dernière remplira les cassures assistée d'une dernière enzyme, la TdT, qui ajoutera au même moment des nucléotides au sein de la réparation pour générer de la diversité supplémentaire dans le locus recombiné [206].

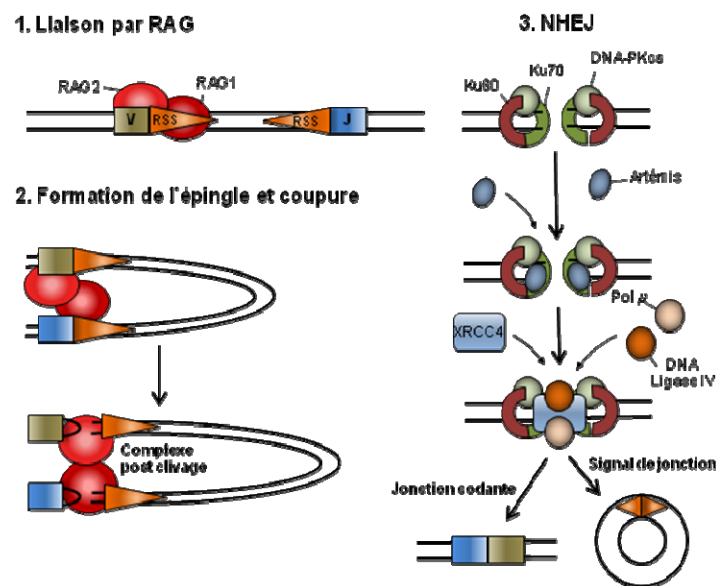


Figure 8: Réarrangement V(D)J et NHEJ

Tel que discuté dans le texte, le rôle des enzymes RAG est de reconnaître et aligner les séquences signal de recombinaison (RSS) jouxtées entre les segments V, D et J pour former une structure en forme d'épingle. Ensuite, les RAG vont couper l'ADN à recombinaison, ce qui va entraîner l'apparition de DSB. Finalement les protéines du NHEJ vont être recrutées séquentiellement et le résultat final sera la formation d'une jonction codante et d'un signal de jonction et ce dernier sera ultérieurement éliminé de la cellule. Inspiré de [206].

La β -sélection

Les DN3 qui réussissent à faire un réarrangement productif expriment la chaîne RCT β qui s'associe avec la chaîne invariante pT α , ainsi qu'avec les protéines du complexe CD3 pour former le pré-RCT [207]. Il a été démontré que l'activation du pré-RCT ne requiert aucun ligand et seule son expression en surface est nécessaire [208, 209]. Une fois le pré-RCT activé, plusieurs protéines kinases (Lck, Fyn, ZAP-70, Syk) ainsi que les protéines adaptatrices LAT et SLP76 seront activées à leur tour et l'aboutissement de cette signalisation sera l'activation des facteurs de transcription responsables des différents changements qui surviendront alors chez la cellule tels que la survie, la seconde phase de prolifération majeure et l'exclusion allélique au locus *Tcrb* (Figure 9) [210-218]. Parmi ces facteurs de transcription, NFAT et NF- κ B sont requis pour la différenciation, alors que c-Myc ainsi qu'encore NF- κ B, sont responsables de la prolifération cellulaire (Figure 9) [219-221]. De plus, le facteur de transcription TCF-1 est requis simultanément pour induire la survie de la cellule, mais ce dernier est activé par une voie de signalisation indépendante du pré-RCT qui est celle des Wnt/bêta-caténine [222, 223].

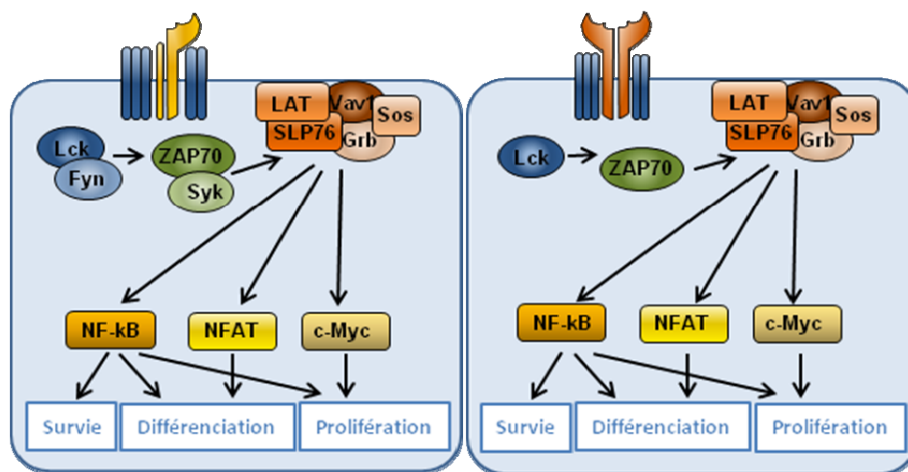


Figure 9: Signalisation pré-RCT vs RCT

Schématisation des différences moléculaires connues entre la signalisation du pré-RCT (panneau à gauche) comparativement à celle activées via le RCT (panneau à droite). Inspiré de [214].

De façon intéressante, la prolifération cellulaire durant la transition DN3-DN4 n'est pas seulement régulée par des facteurs de transcription, mais aussi par certains régulateurs du cycle cellulaire. Entre autre, l'équipe de Sicinski a démontré que la cycline D3 est exprimée chez les DN3 suivant l'induction du pré-RCT [224]. En général, cette cycline est exprimée chez toutes les cellules en prolifération et est requise pour l'entrée en phase S. De plus, ils ont montré que le développement T est bloqué au stade DN3 chez la souris cycline D3-déficiente, alors que cette étape est normale chez les souris D1 ou D2-déficientes [224]. En plus, certains ont suggéré que les inhibiteurs d'entrée en phase S, p16^{INK4a} et p27^{KIP1}, pourraient participer aussi à la régulation du cycle cellulaire pendant la phase de prolifération massive dans cette transition [225, 226].

β -sélection et survie/mort cellulaire

En général, l'apoptose est gouverné par deux voies principales : (i) une voie extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la famille TNF qui vont transmettre à l'intérieur de la cellule un signal d'apoptose, qui activera ensuite les différents membres de la cascade des caspases; (ii) une voie intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie et qui est entre autre activée suivant des dommages à l'ADN ou en réponse à des stress au réticulum endoplasmique (Figure 10) [227, 228]. Ce sont les protéines de la superfamille Bcl-2 qui gouvernent la voie intrinsèque et elles sont divisées en deux groupes selon leur activité anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, BCL2A1, et Bcl-w) ou pro-apoptotique (Bax, Bak, Bok, Bcl-G et Bfk) [227]. Aussi, il existe un sous-groupe chez les pro-apoptotiques, appelé les protéines *BH3-only* et qui est caractérisé par le fait que ces molécules possèdent seulement le domaine BH3 de Bcl-2, sans quoi elles n'ont aucune autre ressemblance avec les membres de cette famille [229]. On retrouve dans ce groupe Bim, Bid, Bad, Bik/Blk/Nbk, Hrk, Noxa et Puma et ces molécules agissent en tant que ligands pour activer les membres pro-apoptotiques et inactiver les membres anti-apoptotiques (Figure 10) [227-229].

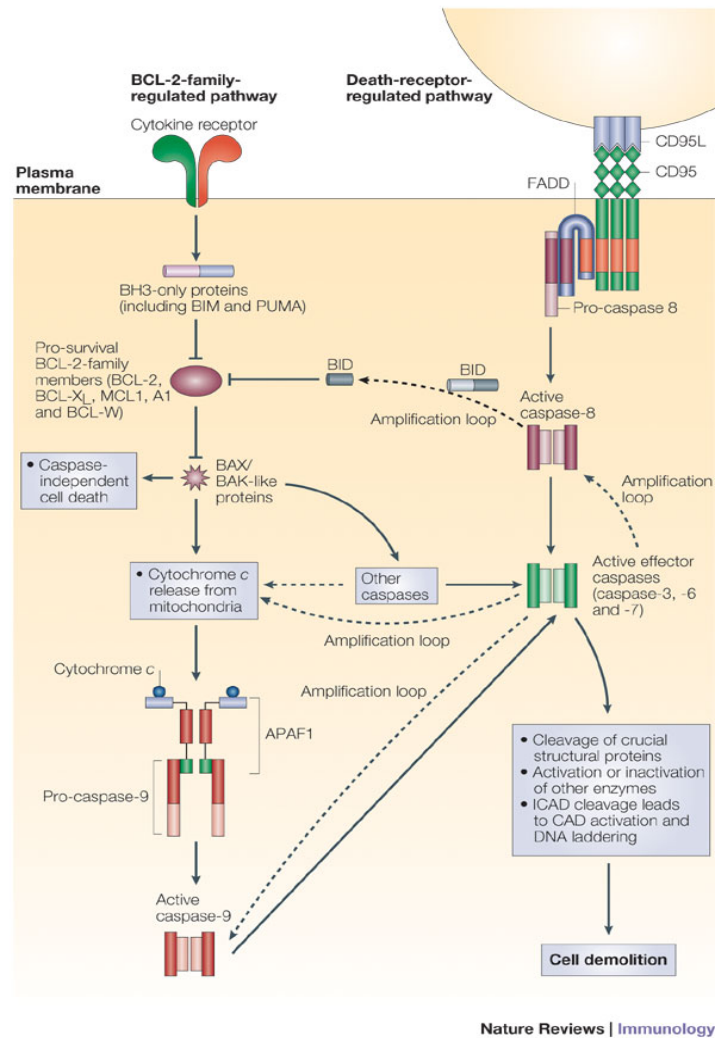


Figure 10: Voies d'apoptose intrinsèques vs extrinsèques

Les mammifères possèdent deux voies de signalisation distinctes qui entraînent l'apoptose des cellules et ces deux voies se rejoignent pour l'activation des caspases effectrices. La voie intrinsèque de la mitochondrie est représentée à gauche et la voie extrinsèque de la signalisation via les récepteurs de mort cellulaire est schématisée à droite. Extrait de [229].

Dans la cellule, les protéines pro-apoptotiques sont situées immédiatement au-dessus de la mitochondrie et suivant un signal d'apoptose, elles entraînent la perte de l'intégrité de

la membrane de la mitochondrie et par conséquent, des pores y sont créés. Ces pores vont mener à la relâche du cytochrome c dans le cytoplasme, et ce dernier pourra alors lier la protéine adaptatrice APAF-1 et l'activation de la cascade de caspases va être initiée (Figure 10) [228, 230]. Cette dernière est constituée de caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) et effectrices (caspases-3, -6 et -7) qui sont responsables des changements morphologiques et biochimiques chez la cellule tels que l'exposition des phosphatidylsérines à la surface, l'arrêt de la réplication, la fragmentation du noyau et du cytosquelette et finalement, la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules environnantes [228, 231].

Les connaissances actuelles des mécanismes de survie/mort mentionnés ci-haut utilisés par les cellules pré-T, ainsi que l'identification des mécanismes qui bloquent les voies apoptotiques une fois les cellules β -sélectionnées demeurent peu définis. Tel que mentionné, avant l'étape DN3, la survie est principalement contrôlée par l'expression de Bcl-2 induite par le récepteur à l'IL-7. Toutefois, Bcl-2 n'est pas impliqué dans la survie des DN3 puisqu'il a été montré qu'à partir de l'étape DN3 les niveaux de Bcl-2 sont très faibles et ce jusqu'au stade DP [232, 233]. De plus, Bcl-2 possède des propriétés anti-prolifératives et par conséquent, elle désavantagerait les cellules lors de la prolifération massive induite par la signalisation du pré-RCT [234]. Finalement, il a été démontré qu'en absence de Bcl-2, la β -sélection s'effectue normalement et aussi que sa surexpression dans des thymocytes pré-RCT-déficients n'entraîne pas d'effet significatif sur leur développement [235, 236]. La molécule BCL2A1 (A1) est responsable de l'inhibition de la mort des cellules β -sélectionnées au stade DN3 [237]. Premièrement, contrairement à Bcl-2, A1 est permissive à la prolifération et est exprimée par les DN3 [237, 238]. Ensuite, l'équipe d'Aifantis a montré que la surexpression de A1 protège les thymocytes de l'apoptose en absence de pré-RCT, et en plus que l'abolition de A1 *in vitro* compromet la survie des thymocytes [237]. De plus, A1 est une des cibles de NF- κ B suivant l'activation du pré-RCT [239, 240].

Deux régulateurs majeurs impliqués dans la surveillance des DSB, ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire jouent des rôles importants dans la survie des thymocytes β -sélectionnés. Le premier est p53 puisque différentes expériences ont montré que les cassures dans l'ADN induites par les événements de recombinaison dans les cellules pré-T peuvent entraîner l'apoptose par l'action de p53 [241, 242]. De plus, l'inactivation de p53 prolonge la survie et la différenciation de thymocytes pré-RCT déficients [242, 243]. Le second régulateur, Chk1, est impliqué indirectement dans la survie, puisque le rôle général de ce dernier est d'induire l'arrêt du cycle cellulaire lors de DSB. C'est l'équipe de Tak W. Mak qui a observé, chez un modèle de souris conditionnel Chk1-déficient, un blocage au stade DN3 qui est causé par une augmentation de l'apoptose [244]. Dans ce contexte, il est possible que l'abolition de Chk1 entraîne l'impossibilité pour les DN3 d'arrêter leur cycle cellulaire au cours du réarrangement V(D)J et que, par conséquent, les thymocytes meurent puisqu'ils accumulent des erreurs fatales de recombinaison. Par contre, cette supposition ne fut pas directement investiguée par les auteurs de cet article. Il a été montré de façon générale que la protéine ATM active directement Chk1, Chk2 et p53 [245, 246]. Un rôle potentiel pour ATM dans la régulation de la survie/mort cellulaire au stade DN3 pourrait exister, mais cette possibilité n'a pas encore été élucidée. Puisque la contribution directe de ATM a été démontrée à l'étape DP du développement thymique, ce sujet sera approfondi dans la section suivante. Finalement, vers la fin de la transition DN3-DN4, les thymocytes diminuent provisoirement l'expression des gènes *Rag-1/2*, diminuent l'expression de CD25, expriment transitoirement le marqueur d'activation CD69 et finalement se différencient en DN4 [217, 247-251].

2.2 Le développement thymique avancé

2.2.1 La transition DN4 – DP

L'étape DN4, aussi appelée pré-DP, est principalement marquée par de la prolifération massive induite par la β -sélection et aussi par la faible expression en surface des corécepteurs CD4 et CD8 [252-254]. Rapidement, les DN4 vont initier la transcription du locus *Tcra*, cesser de se diviser et vont exprimer les corécepteurs CD4 et CD8 à leur surface pour devenir des cellules appelés DP RCT^{faible} en raison de leur faible expression en surface du pré-RCT [255-257]. Alors, les niveaux de RAG-2 à l'intérieur de la cellule vont recommencer à augmenter pour la seconde phase de recombinaison et les DP vont avoir environ trois jours pour faire des réarrangements V-J au locus *Tcra*, après quoi ils mourront par négligence si le réarrangement n'est pas productif [258-260]. Plusieurs facteurs contribuent à la régulation de la survie des DP pendant cette période, tels que le facteur de transcription ROR γ , les facteurs de transcription TCF-1/LEF-1 et l'enzyme PARP-2 [223, 261-263]. ROR γ et TCF-1/LEF-1 contrôlent l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-X_L [261, 262]. Effectivement, il a été montré que Bcl-X_L est le facteur induisant la survie des DP et que sans l'activité de ROR γ et TCF-1/LEF-1, Bcl-X_L n'est pas exprimé et les DP meurent par négligence [261, 262, 264]. En général, PARP-2 est principalement impliqué dans la surveillance et le maintien de l'intégrité génomique et est activé par des cassures dans l'ADN [265, 266]. L'équipe de Murcia a montré, à l'aide d'un modèle de souris PARP-2-déficient, que la survie des DP *Parp-2*^{-/-} est compromise et que ceci corrèle avec une surexpression de la molécule pro-apoptotique Noxa [263]. De plus, ils ont montré que les thymocytes DP *Parp-2*^{-/-} sont fortement sensibles à l'apoptose induite par des stimuli p53-dépendants [263]. Finalement, les auteurs ont aussi observé que les thymocytes *Parp-2*^{-/-} ont une expression réduite de leur RCT, ainsi qu'un répertoire TCR α anormal, suggérant que PARP-2 participerait à la survie de la cellule pendant les multiples réarrangements du RCT α précédant la sélection positive [263].

Contrôle et surveillance des coupures faites dans l'ADN pendant la recombinaison V(D)J

Lors d'un réarrangement V(D)J physiologique, il a été démontré que le NHEJ et les enzymes RAG sont nécessaires et suffisants pour compléter l'opération de recombinaison et ainsi générer la diversité essentielle aux réponses immunes [267-269]. Toutefois, il existe un autre mécanisme beaucoup plus général de surveillance et de réponses cellulaires aux DSB qui est présents pendant ce processus, mais qui est en attente de signaux supplémentaires pour agir [270]. Ce système est requis, par exemple, dans le cas d'un mauvais appariement des DSB pendant le réarrangement V(D)J pour éliminer les aberrations chromosomiques qui pourraient être à l'origine de tumeurs lymphoïdes ou causer des déficiences immunitaires sévères [242, 271, 272]. Ce mécanisme est coordonné par la protéine ATM qui est généralement activée en réponse aux agents génotoxiques qui créent des DSB tels que les radiations ionisantes [273]. De façon générale, suivant l'apparition de DSB dans l'ADN, ATM va agir en renforçant le point de contrôle de la phase G₁/S par l'activation de deux différentes voies de signalisation (Figure 11) : la première est p53-indépendante et comprends la phosphorylation par ATM des kinases Chk1 et Chk2 qui pourront ainsi phosphoryler et inactiver la phosphatase Cdc25A. Par conséquent, Cdk2 demeure inactive et le cycle cellulaire est bloqué en G₁. La deuxième est p53-dépendante et ATM y intervient de deux façons : (i) ATM phosphoryle Mdm2 pour inhiber son interaction avec p53, ce qui libère et stabilise p53 (en condition normale, p53 est fixé à Mdm2, ce qui conduit à sa dégradation et explique la faible abondance de p53 dans les cellules en bon état); (ii) ATM phosphoryle directement p53 et ceci renforce la stabilité de p53 qui peut alors activer p21^{CIP1} pour inhiber l'entrée en phase S [273, 274]. Un autre événement important est la phosphorylation par ATM de l'histone H2AX qui fait alors une marque épigénétique adjacente aux DSB dans l'ADN et cet événement est associé avec le recrutement de différents facteurs requis pour la réparation de l'ADN (Figure 10) [275-278]. Il est intéressant de mentionner ici que la signalisation induite par p53 constitue un bon exemple de couplage entre différents événements cellulaires, par exemple la

prolifération et la survie, puisque dans le cas présent, en plus d'activer $p21^{CIP1}$, p53 régule certains gènes pro-apoptotiques tels que *Bax*, *Bid*, *Puma* et *Noxa* [279-281]. ATM est donc essentielle au contrôle des DSB puisqu'il fait la balance entre le temps d'arrêt en G_1 pour permettre à la cellule d'essayer de réparer son ADN endommagé et la condamnation à la mort cellulaire si les dommages sont trop importants [282].

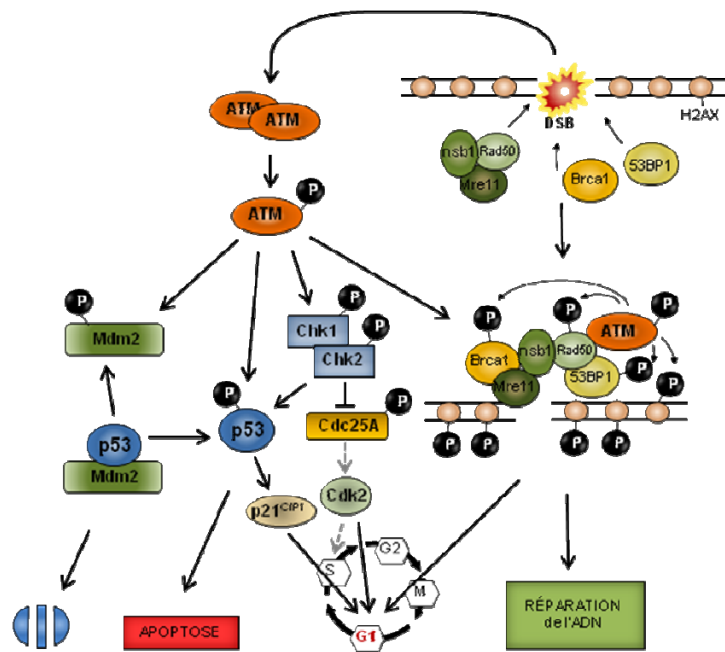


Figure 11: Voies de signalisation régulées par ATM

Lors de l'apparition de DSB, différentes protéines (nsb1, Rad50, Mre11, 53BP1 et Brca1), appartenant au système de surveillance des bris doubles brins faits dans l'ADN vont être recrutées et simultanément, ATM va être phosphorylée. Ensuite, ATM va phosphoryler à son tour les différentes protéines recrutées ainsi que l'histone H2AX. Au même moment, ATM va induire deux autres voies de signalisation : la voie p53-indépendante, représentée par les kinases Chk1/2 qui régulent le cycle cellulaire ainsi que la voie p53-dépendante qui induit principalement l'apoptose des cellules si les lésions dans l'ADN sont trop importantes. Voir le texte pour les autres détails. Inspiré de [283].

Plusieurs études ont aidé à révéler la contribution du système de surveillance des DSB contrôlé par ATM pendant la recombinaison V(D)J chez les thymocytes DP [284, 285].

Entre autre, il a été démontré que des thymocytes déficients pour certaines composantes du NHEJ accumulent des DSB, ce qui entraîne l'accumulation de p53 [242, 285]. Aussi, l'étude de souris *p53^{-/-}scid* (souris déficientes pour la sous-unité catalytique ADN-PKcs) a permis de déterminer que p53 est requis pendant le réarrangement V(D)J pour empêcher l'apparition de LT aberrants [242, 284, 285]. L'équipe de Singer a indiqué qu'il existe des mécanismes d'apoptose dépendants d'ATM et indépendants de p53 qui permettent aux DP de survivre suffisamment longtemps pour réaliser le réarrangement de leur locus *Tcra* [286]. Effectivement, suite à l'induction de dommages à l'ADN *in vitro* à l'aide de différentes doses d'actinomycine D, ils ont montré que des DP *p53^{-/-}* meurent à la même fréquence que des DP de souris normale, alors que des DP *Atm^{-/-}* sont beaucoup plus résistants [286]. L'implication secondaire de la voie ATM pendant le réarrangement V(D)J est bien illustré par le fait que les thymocytes *Atm^{-/-}* qui réussissent à faire un réarrangement efficace, expriment un RCT et font un développement T complet [287]. De plus, les thymocytes *Atm^{-/-}* possèdent un répertoire diversifié de chaîne TCR β et sont capables de faire les différentes rondes de recombinaison du TCR α [288]. Par contre, la cellularité thymique est grandement réduite chez les souris *Atm^{-/-}* et la cause principale est la présence d'altérations au niveau de la recombinaison du locus *Tcra*, ce qui compromet la formation et la survie des DP RCT^{int} [288, 289]. Récemment, il a été montré qu'ATM est essentiel pour prévenir la transmission de dommages faits à l'ADN lors du réarrangement V(D)J aux LT matures et ceci empêche la propagation de translocations oncogéniques [290]. Finalement, la phosphorylation de H2AX a aussi été observée lors de la formation de DSB induits par les RAG-1/2 au cours de la recombinaison V(D)J, ce qui indique encore une fois qu'ATM participe pendant ce processus [270, 291]. Tous ces résultats démontrent qu'ATM est important, mais pas essentiel pour le réarrangement V(D)J. Toutefois, comment ATM distingue une recombinaison V(D)J normale vs altérée, et aussi quel est le mécanisme qui permet à ATM d'introduire le délai de réarrangement avant que l'apoptose soit enclenchée, sont des questions qui demeurent encore sans réponse.

Finalement, l'expression d'une chaîne RCT α fonctionnelle remplace la chaîne invariante pT α et forme avec la chaîne RCT β le complexe du RCT dont l'expression en surface va augmenter à un niveau intermédiaire pour former les DP RCT^{int} [256]. De plus, la recombinaison du *Rcta* est terminée soit par la sélection positive, qui entraînera l'arrêt de l'expression des RAG-1/2, soit par la mort cellulaire [292-294].

2.2.2 La sélection positive

La fonction d'un LT mature repose sur la compétence de son RCT à reconnaître un antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce dernier est un ensemble d'antigènes qui permettent au système immunitaire de faire la distinction entre les cellules du soi (qui appartiennent à l'organisme) et celles du non-soi (étrangères à l'organisme). Chaque RCT est généré aléatoirement, ce qui donne l'avantage de faire face à l'immense variété d'antigènes rencontrés quotidiennement, mais qui engendre aussi de très nombreux RCT qui sont inutiles pour défendre l'organisme car ils ne seront pas reconnus par les complexes CMH/peptides. La sélection positive est donc requise au cours de la formation des LT pour faire le tri parmi les thymocytes DP RCT^{int} et permettre seulement à ceux qui sont compétents et restreints aux molécules du soi de survivre et continuer leur développement [295]. Les ambassadrices de la sélection positive sont les cellules corticales épithéliales thymiques (cTEC) [127]. En effet, ces dernières exhibent des complexes CMH de classe I (CMHI) et CMH de classe II (CMHII) contenant une multitude de différents peptides du soi et c'est en cheminant à travers elles que les DP vérifient l'efficacité de leur nouveau RCT [296, 297]. A cette étape, afin que la cellule survive et se différencie, le RCT doit être compatible avec le complexe CMH-peptides et en plus, l'interaction entre les deux doit être de faible affinité [295]. Puisque les thymocytes n'ont qu'un bref moment pour exprimer un RCT et qu'en plus ce récepteur doit avoir la bonne affinité avec les complexes CMH-peptides, la majorité des DP ne pourront remplir ces conditions et mourront par négligence [260, 298, 299]. Au contraire, une faible proportion de DP va

correspondre à ces exigences et ces derniers vont subir des changements phénotypiques, tels que l'expression transitoire du CD69 et l'augmentation de l'expression du CMH de classe I et du RCT (DP RCT^{fort}) [300, 301]. En contrepartie, l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 va diminuer transitoirement (CD4^{faible}CD8^{faible} ou *double dull*) et par la suite un seul des deux corécepteurs sera exprimé [302-304]. Suite à la sélection positive, la survie est assurée grâce à la réexpression du récepteur à l'IL-7 [305].

Les voies de signalisation activées et les facteurs de transcription utilisés pendant la sélection positive sont très similaires à ceux de la β -sélection (Figure 9). À l'étape DP, la chaîne CD3 δ devient essentielle pour l'activation de la voie ERK1/2 pendant la sélection positive [306]. Une autre très importante différence est que le pré-RCT est activé sans aucun ligand extracellulaire alors que le RCT nécessite l'interaction avec le complexe CMH-peptides [208, 209]. Finalement, la seule différence connue au niveau de la signalisation intracellulaire est que celle via le RCT nécessite seulement Lck et ZAP-70 pour être activée, alors que celle via le pré-RCT dépend en plus de Fyn et de Syk (Figure 9) [211, 307]. En fait, ce sont plutôt les résultats engendrés par ces différentes voies de signalisation qui illustrent les différences entre la β -sélection et la sélection positive et ces résultats sont dépendants de l'accessibilité des différents gènes pendant ces différentes étapes du développement thymique.

2.2.3 La sélection négative

Les thymocytes qui sont positivement sélectionnés vont subir plusieurs changements jusqu'à leur engagement définitif vers la lignée SP CD4⁺ ou SP CD8⁺. Entre autre, les thymocytes vont exprimer le récepteur de chemokine CCR7 qui leur permettra de migrer vers la médulla [308]. Il est intéressant de mentionner ici que l'interaction entre les ligands de CCR7 (CCL19 et CCL21) produit par les cellules médullaires thymiques (mTEC) et CCR7 à la surface des thymocytes constitue un bon exemple de *thymic crosstalk* [309]. En effet, il a été observé chez des souris déficientes pour CCR7 ou pour ses ligands que leurs

DP sont bloqués dans le cortex [309]. De plus, chez ces modèles de souris, ainsi que chez des souris *Rcta*^{-/-} et *Zap-70*^{-/-} chez lesquelles l'abolition de la sélection positive engendre l'incapacité d'exprimer CCR7, l'architecture médullaire est gravement altérée [124, 309-311].

Les thymocytes positivement sélectionnés vont ensuite passer une autre étape de contrôle pour leur RCT qui est la sélection négative. Cette dernière est composée de trois différents mécanismes qui assurent que les thymocytes qui vont continuer leur maturation ne posséderont pas un RCT de trop forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi et ainsi empêcher des thymocytes potentiellement auto-réactifs de causer de l'auto-immunité en périphérie [312, 313]. La délétion clonale est le principal mécanisme impliqué dans la sélection négative [312]. L'anergie ainsi que la substitution du récepteur (*receptor editing*) sont les deux autres mécanismes identifiés à ce jour, mais ils jouent des rôles de second plan dans ce processus [314-316]. La sélection négative peut se produire dans le cortex, mais le répertoire de peptides présenté par les cTEC est limité et les DP ne sont pas des cibles faciles pour la sélection négative [317, 318]. Cette dernière survient majoritairement dans la médulla puisqu'elle est composée de DC et de mTEC qui sont spécialisées dans l'induction de la tolérance chez les SP. Une étude publiée en 1990 par le groupe de Singer démontra que les cellules stromales du thymus radio résistantes (mTEC) sont responsables de l'anergie, alors que les cellules radio sensibles (DC) sont plutôt responsables de la délétion clonale [319]. En accord avec ces résultats, il a été montré que les mTEC font une sélection négative incomplète en absence de cellules hématopoïétiques CMH de classe II⁺ et en plus, que les mTEC sont nettement moins efficaces que les DC à cette étape pour supprimer les SP qui entreprennent de faire inspecter leur RCT [320-323]. Toutefois, bien que ces deux populations cellulaires soient nécessaires pour empêcher le développement de maladies auto-immunitaires, la contribution relative de chacune au phénomène de délétion clonale demeure ambiguë à cause des variations obtenues selon le modèle expérimental utilisé. Par contre, ce qui est mieux défini actuellement est la capacité presque unique qu'ont les mTEC à présenter des antigènes normalement retrouvés dans les

tissus périphériques (TRA) [324, 325]. Pour ce faire, les mTEC expriment le facteur de transcription AIRE qui est essentiel à l'expression ectopique des TRA [324, 325]. L'importance de AIRE pour l'induction de la tolérance centrale a été mise en évidence chez l'homme et chez la souris par l'observation que sa déficience cause un grave syndrome auto-immun multi organes appelé APECED [326]. Il a été démontré qu'une très faible proportion de mTEC exprime dans le thymus un antigène du soi en particulier [327, 328]. Si les mTEC expriment les TRA, mais que cette expression est limitée, alors comment la tolérance est induite chez toutes les SP TRA-spécifiques? Il est bien connu que les DC composent aussi la médulla et qu'elles sont importantes pour une sélection négative efficace. Toutefois, elles n'expriment pas directement les TRA [312]. C'est Gallegos et Bevan qui élucidèrent cette énigme en démontrant que les DC du thymus sont compétentes dans la présentation croisée des TRA qui ont été préalablement générés par les mTEC [329]. Premièrement, les auteurs ont utilisé la souris transgénique (Tg) RIP-OVA chez laquelle OVA est lié à la membrane et est exprimé principalement par les mTEC du thymus [330]. Ensuite, ils ont croisé ces souris avec des souris CMHI-déficientes pour créer de nouvelles souris chez lesquelles les mTEC expriment OVA, mais sont incapables de la présenter en surface. Alors, ils ont irradié ces souris et les ont reconstituées avec de la moelle de souris Tg OT-1. Ainsi, ils ont observé que les cellules présentatrices d'antigène (CPA) dérivées de la moelle osseuse, en l'occurrence les DC, peuvent acquérir les TRA des mTEC et induire une délétion clonale efficace des SP.

La plupart des protéines proximales de la signalisation du RCT requise pour la sélection positive sont aussi requises pour la sélection négative. Par contre, les voies de signalisations activées semblent différentes et sont encore très peu définies. Tel que mentionné plus haut, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque peuvent être activées pour induire l'apoptose. Plusieurs études ont montré que les interactions Fas-Fas ligand ne sont pas nécessaires à la sélection négative [331]. Par contre, certains membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés dans ce processus. Entre autre, il a été démontré que les souris Bim-déficientes présentent une réduction importante de la sélection négative suivant l'administration d'anti-CD3, du

superantigène SEB ou de peptides antigéniques [332]. De plus, une autre étude a montré que l'activité pro-apoptotique de Bim requière celle de Bax et/ou de Bak [333]. Aussi, Bcl-2 ne semble pas intervenir dans ce processus puisqu'il a été montré que sa surexpression chez les thymocytes n'est pas suffisante pour empêcher leur sélection négative [334, 335]. Une autre molécule participant à la sélection négative est la kinase MINK puisque son abolition, via l'utilisation d'un siRNA, entraîne une inefficacité de la délétion clonale [336]. De plus, les auteurs de cet article ont montré que MINK est requise pour activer Bim [336]. Une autre molécule activée suite à la stimulation du RCT est Nur77 [337, 338]. Il a été démontré que les thymocytes d'une souris Tg exprimant une version dominante-négative de Nur77 ne peuvent initier la sélection négative et en plus que l'expression constitutive de Nur77 résulte en une augmentation marquée de l'apoptose [339]. Toutefois, une équipe a montré que l'abolition de *Nur77* chez la souris n'entraîne pas une altération marquée de la sélection négative [340]. Par la suite, il a été démontré que *Nor1* est aussi impliqué dans la sélection négative des thymocytes et qu'il est redondant à *Nur77*, ce qui pourrait expliquer pourquoi la sélection négative n'est pas altérée chez la souris *Nur77*^{-/-} [341].

2.2.4 Le choix SP CD4⁺ versus SP CD8⁺

Suite à la sélection positive, la cellule s'engage soit vers la lignée SP CD4⁺ ou vers la lignée SP CD8⁺. Ce choix est déterminé par la restriction de leur RCT à un CMH et donc invariablement, une cellule DP dont le RCT interagit et reçoit des signaux d'un CMHII va devenir une cellule SP CD4⁺, alors qu'un DP qui reçoit des signaux par un CMHI va se différencier en SP CD8⁺ [342].

Le mécanisme exact qui détermine comment la spécificité d'un RCT peut dicter vers quelle lignée va s'engager une cellule DP est encore aujourd'hui un sujet de débat. Pendant quelques années, deux modèles ont circulé pour tenter d'expliquer ce phénomène (Figure 12) : le modèle stochastique/sélectif et celui de l'instruction [343]. Le modèle stochastique

propose que les DP s'engagent aléatoirement vers une des deux lignées et ce, indépendamment de la spécificité de leur RCT. Lorsque le corécepteur exprimé s'avèrera incompatible avec l'identité génique de la cellule, cette dernière sera éliminée puisqu'elle sera incapable de recevoir les signaux de survie qui dépendent de la coordination du bon corécepteur avec la spécificité de son RCT. [344-346]. Pour sa part, le modèle de l'instruction stipule que le choix d'engagement vers une lignée s'effectue selon l'identité du CMH impliqué pendant la sélection positive et que par conséquent, la transcription du corécepteur ignoré se terminera [347]. Plusieurs résultats contradictoires ont été générés depuis et ceci entraîna la révision de ces modèles. Entre autre, il a été observé que sous certaines conditions un développement SP CD8⁺ pouvait être induit par un CMHII plutôt que via un CMHI [348]. Ce résultat a contredit le modèle de l'instruction qui postule que l'engagement vers la lignée SP CD8⁺ dépend de signaux qualitatifs distincts qui ne peuvent être induits que par un CMHI. Aussi, des expériences chez des souris Tg exprimant constitutivement un des deux corécepteurs ont montré que le nombre de thymocytes mal orientés dans ces souris est très faible et que le ratio CD4/CD8 demeure le même, ce qui a contredit le modèle stochastique/sélectif [347, 349, 350].

Par la suite, le modèle instructif a été modifié par la proposition que les DP sont dirigés par des différences dans la force du signal induit lors de l'engagement simultané du RCT et du corécepteur au moment de la sélection positive (Figure 12) [351]. Ceci repose sur l'observation qu'une plus grande quantité de tyrosine kinase Lck est liée à la queue cytoplasmique du CD4 que chez le CD8 et par conséquent, que l'engagement conjoint du TCR/CD4 va générer un plus fort signal à l'intérieur de la cellule que celui du TCR/CD8 [352-354]. L'élaboration de ce nouveau modèle, fut motivée entre autre, par l'observation que l'utilisation d'un transgène codant pour un corécepteur chimérique composé du CD8 α associé à la queue cytoplasmique du CD4, résulte en la production de SP CD4⁺ restreints au CMHI [351]. De plus, ce modèle a permis d'expliquer pourquoi une forte activité kinase, suivant la manipulation de Lck, des kinases TEC ou des ERK-1/2, entraîne un

développement SP CD4⁺, alors que la diminution de l'activité des mêmes kinases favorise plutôt un développement SP CD8⁺ [355-361].

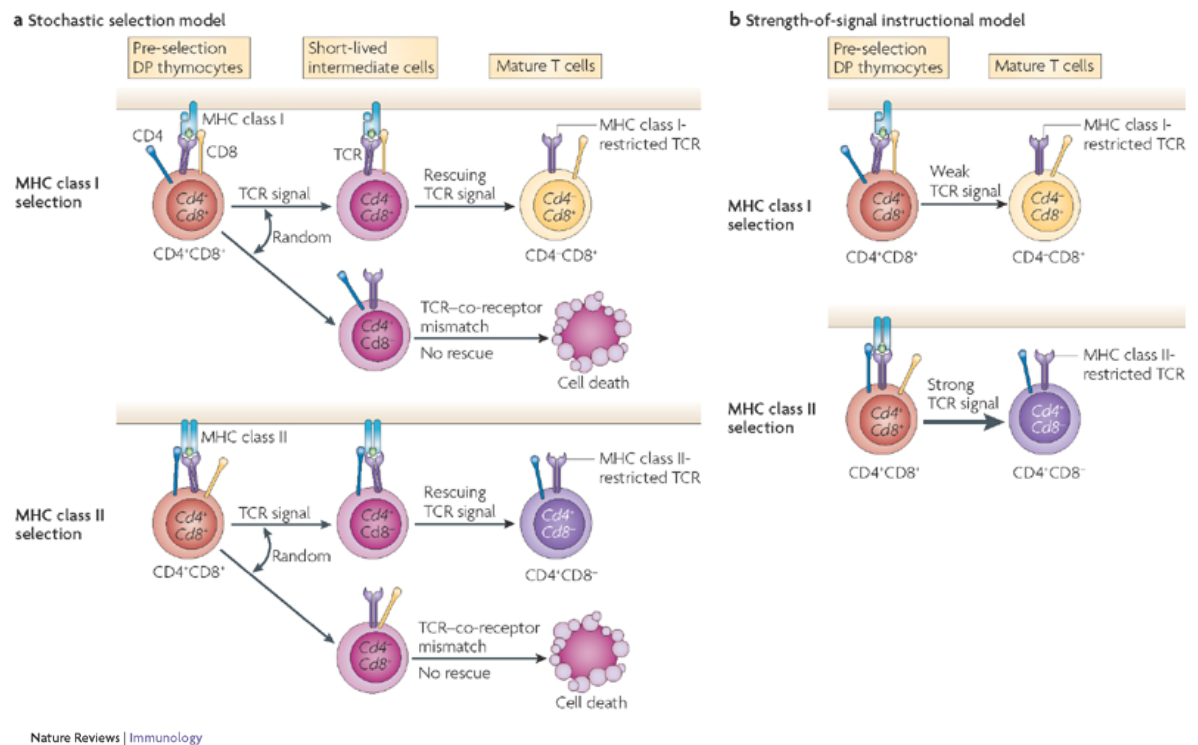


Figure 12: Les modèles classiques de l'engagement SP CD4⁺ vs SP CD8⁺

Le modèle stochastique (a) postule que les DP qui sont positivement sélectionnés reçoivent des signaux qui vont entraîner l'arrêt de l'expression d'un des deux corécepteurs de façon aléatoire. Ceci entraîne la génération de cellules intermédiaires qui possèdent une courte durée de vie et qui vont rapidement mourir par apoptose si elles ne reçoivent pas un second signal de survie qui dépend de la coordination du bon corécepteur avec la spécificité de son RCT. Le modèle de l'instruction de la force du signal (b) postule qu'un faible signal va favoriser l'arrêt de la transcription du gène *Cd4*, alors qu'un fort signal va plutôt entraîner l'arrêt de la transcription du gène *Cd8*. Par conséquent, la signalisation via le CD8 et le RCT restreint à un CMHI est faible et générera des SP CD8⁺ mature, alors que celle via le CD4 et le RCT restreint à un CMHII est forte, ce qui entraînera le développement de SP CD4⁺. Extrait de [343].

Toutefois, ce modèle fut à son tour réfuté suivant l'observation qu'une altération directe de l'intensité de la signalisation du RCT par la diminution du nombre d'ITAM n'entraîne pas un choix SP CD4⁺ vs SP CD8⁺ biaisé, mais plutôt une diminution du nombre total de SP produits [362].

Plusieurs observations ont mené à l'élaboration du modèle actuel qui est le modèle de cinétique de la signalisation (Figure 13). Ce modèle est une version améliorée du modèle de l'instruction précédent et énonce que c'est la durée du signal qui dicte le choix de lignée et non pas l'intensité. Il a été montré qu'après avoir reçu le signal de la sélection positive, les thymocytes vont passer par un stade intermédiaire CD4^{faible}CD8^{faible} et vont devenir ensuite CD4⁺CD8^{faible}. En effet, il a été démontré que ce stade de différenciation précède le choix SP puisqu'il a été observé que la population CD4⁺CD8^{faible} est présente autant chez la souris CMHI-déficiente que CMHII-déficiente [344, 345]. De plus, des cellules SP CD4⁺ et SP CD8⁺ sont générées à partir de cellules CD4⁺CD8^{faible} provenant de souris CMHII-déficientes transférées intrathymiquement, alors que le transfert de cellules CD4^{faible}CD8⁺ ne donne naissance qu'à des SP CD8⁺ [363]. Il est donc maintenant accepté que les cellules CD4⁺CD8^{faible} ne sont pas engagées dans une lignée et qu'elles sont les précurseurs des LT matures CD4⁺ et CD8⁺ [363, 364]. Ce nouveau modèle stipule que la diminution de l'expression du *Cd8* à l'étape CD4⁺CD8^{faible} entraîne l'impossibilité pour la cellule d'être activée par un CMHI et par conséquent, c'est un signal originant d'un CMHII qui persiste et entraîne la cellule vers la lignée SP CD4⁺ [364-366]. Bien entendu, ceci n'explique pas comment les SP CD8⁺ sont produites et c'est pourquoi un ajout important se greffe à ce modèle : le renversement du corécepteur (Figure 13). C'est l'équipe de Singer qui démontra que l'IL-7 permet aux cellule CD4⁺CD8^{faible} d'arrêter la transcription du *Cd4* et de ré-initier celle du *Cd8* [364]. En accord avec ces résultats, il a été montré aussi qu'une signalisation soutenue via le RCT inhibe la transmission des signaux via le récepteur à l'IL-7 [367]. En plus de ces signaux, plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés pour l'engagement vers une lignée et les principaux sont Th-POK, les protéines RUNX et GATA-3.

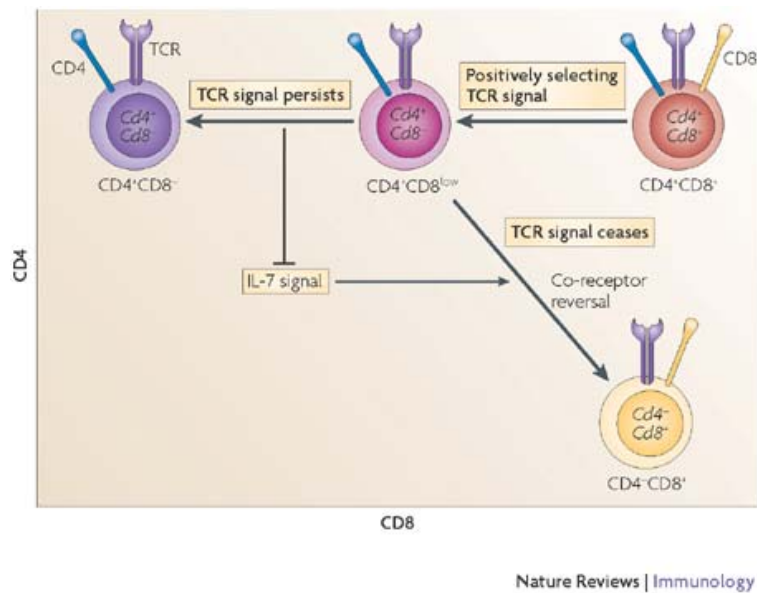


Figure 13: Modèle de la cinétique de la signalisation et renversement du corécepteur

Peu importe la spécificité du RCT, les signaux de la sélection positive vont entraîner l'arrêt de l'expression du gène *Cd8* chez le DP et ce dernier va devenir un thymocyte $Cd4^+Cd8^-$ intermédiaire. A cause de l'absence de transcription du gène *Cd8*, le thymocyte $Cd4^+Cd8^-$ intermédiaire présente un phénotype $CD4^+CD8^{\text{faible}}$ et ce dernier représente la cellule chez laquelle le choix d'engagement vers une lignée va être faite. Un signal persistant via le RCT des thymocytes $Cd4^+Cd8^-$ va empêcher l'activation de la signalisation du récepteur à l'IL-7 et par conséquent induira la différenciation en SP $CD4^+$. Au contraire, l'arrêt ou l'altération de la signalisation via le RCT rendra la cellule permissive à la signalisation du récepteur à l'IL-7 et dans ce cas, le renversement du corécepteur surviendra chez les thymocytes $Cd4^+Cd8^-$ qui se différencieront en SP $CD8^+$.

Tiré de [343]

Th-POK (*T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor*)

Aussi connue sous le nom de cKrox et ZFP76, ce facteur de transcription a originellement été décrit comme un répresseur transcriptionnel de l'expression du gène du collagène [368, 369]. En 1998, l'équipe de Kappes caractérisa une nouvelle souris, baptisée souris HD (*helper T cell deficient*), chez laquelle une mutation spontanée entraîne l'absence totale de développement des LT $CD4^+$ [370]. Il fut mis en évidence chez cette souris que

les thymocytes restreints par le CMHII n'étaient pas bloqués dans leur développement, mais plutôt redirigés vers la lignée SP CD8⁺ et ce, indépendamment de l'affinité du RCT [371]. Par la suite, deux équipes indépendantes ont démontré que le gène muté chez la souris HD est *Zfp76* qui code pour la protéine Th-POK [372, 373]. Cette dernière est effectivement exprimée uniquement chez les SP CD4⁺ [369]. Plus spécifiquement, il a été montré que Th-POK est premièrement exprimée chez les DP CD4⁺CD8^{faible}, mais qu'à ce moment, son expression est trop faible pour influencer le choix CD4/CD8 [369]. L'expression de Th-POK augmente chez les cellules CD4⁺CD8^{faible} suivant l'induction du RCT, ce qui concorde avec le modèle de cinétique de la signalisation [372, 373]. L'équipe de Sun a aussi montré que l'expression constitutive de Th-POK conduit à la génération exclusive de SP CD4⁺ et ce, même dans différents modèles de souris Tg où le RCT est restreint pour un CMHI [373]. Th-POK est donc nécessaire et suffisant à l'engagement vers la lignée SP CD4⁺.

Les protéines RUNX (*Runt-related transcription factors*)

Les protéines de la famille RUNX sont reconnues pour leurs rôles en tant que facteurs de transcription qui lient l'ADN et affectent l'expression de gènes [374, 375]. Dans le thymus, RUNX1 est exprimé principalement par les DN, alors que RUNX3 est exprimé chez les SP CD8⁺ post-sélectionnés [376]. Un rôle pour les protéines RUNX dans le choix CD4/CD8 a été mis en évidence suivant l'observation que ces dernières lient les séquences inhibitrices de *Cd4* [376]. De plus, une déficience en RUNX3 empêche l'inhibition de *Cd4*, alors que l'expression Tg de RUNX3 est suffisante pour empêcher la production de SP CD4⁺ [376-378]. Tout comme pour Th-POK, l'expression de RUNX3 débute faiblement au stade CD4⁺CD8^{faible} et augmente pendant la différenciation en SP CD8⁺ [376, 379, 380]. RUNX3 pourrait donc être le régulateur du phénomène de renversement du corécepteur en inhibant l'expression du gène *Cd4* et en ré-initiant celle du *Cd8*. L'an dernier, il a été démontré que les protéines RUNX lient une séquence dans le gène *Zfp76* et empêchent l'expression de Th-POK [381].

GATA-3

GATA-3 est un facteur de transcription qui est important pour le développement thymique précoce et aussi pour l'engagement vers la lignée SP CD4⁺ [382]. GATA-3 est exprimé chez deux populations cellulaires thymiques et son expression est augmentée chez les DP suivant l'activation du RCT [382, 383]. De plus, sa surexpression inhibe sélectivement la différenciation SP CD8⁺ et son abolition conditionnelle entrave le développement SP CD4⁺ [383-385]. Bien qu'il soit nécessaire au développement des SP CD4⁺, GATA-3 n'est pas un facteur d'engagement *per se* puisqu'il a été démontré que la surexpression de GATA-3 dans des thymocytes restreints à un CMHI ne redirige pas ces derniers vers la lignée SP CD4⁺ [383].

Une fois les thymocytes définitivement engagés vers une lignée, ils vont faire leur maturation finale et commencer à exprimer les marqueurs d'émigration S1P₁ et CCR7 [386, 387]. Finalement, seulement 3 à 5% des thymocytes sortiront vainqueurs du thymus via les veinules post-capillaires à la jonction cortico-médullaire du thymus avec toutes les caractéristiques requises pour défendre efficacement l'organisme [388-390].

2.3 Les MAPK et le développement thymique

Tel que mentionné plus haut, de façon générale les MAPK sont exprimées ubiquitairement et elles jouent des rôles essentiels dans de nombreux phénomènes biologiques tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le développement des LT ne fait pas exception quant à l'implication essentielle de plusieurs de ces MAPK et ce sujet sera discuté dans la présente section (Figure 14).

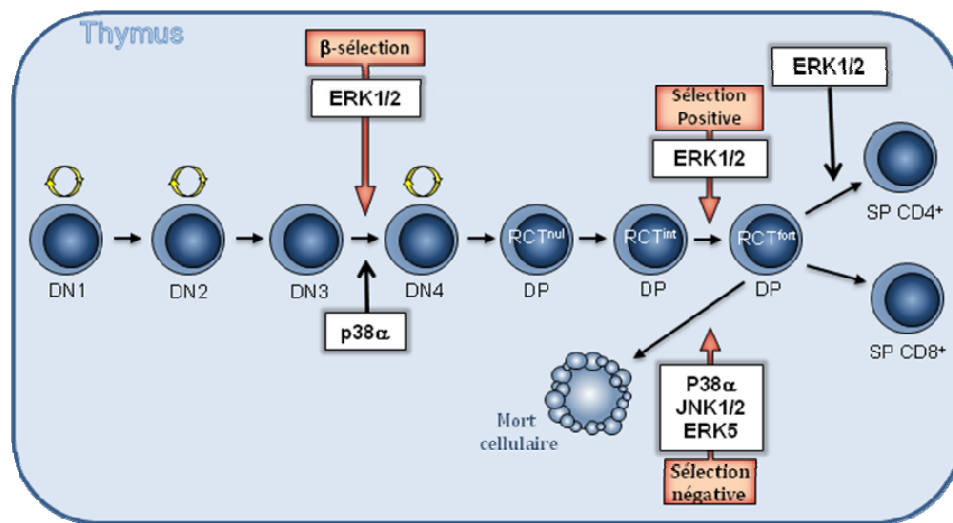


Figure 14: Rôles des MAPK dans le développement intrathymique

Schématisation du développement des LT ainsi que des différentes étapes où les MAPK jouent des rôles. Voir le texte qui suit pour les détails. Inspiré de [391]

ERK1/2: rôles dans la signalisation pré-RCT, RCT et dans la différenciation SP CD4⁺

Plusieurs études ont révélé l'implication de la voie des MAPK ERK1/2 au cours du développement des LT. Chronologiquement, un rôle dans la sélection positive lui a tout d'abord été attribué suivant l'observation que cette dernière est altérée chez différentes souris Tg exprimant des molécules dominantes-négatives de cette voie, telles que Ras, Raf et MEK1 [392-395]. De plus, des souris déficientes pour des molécules situées en amont dans la voie de signalisation ERK1/2, telles que la souris *RasGRP*^{-/-} et la souris *Ms. T-less* possédant une délétion de la kinase *Itpkb*, ont aussi présenté une altération marquée de la sélection positive [396, 397]. Finalement, l'équipe de Hedrick a confirmé *in vivo* le rôle essentiel de ERK1/2 dans la sélection positive en créant différentes souris conditionnelles ERK2-déficientes et en les croisant avec des souris *Erk1*^{-/-} [398]. De plus, plusieurs études ont contribué à montrer que ces dernières ne participent pas à la sélection négative [359, 394, 395, 399, 400].

Les résultats précédents ont permis de soulever l'hypothèse que, puisque les voies de signalisation du pré-RCT et du RCT sont similaires, il serait possible que la voie ERK1/2 participe à la β -sélection. Toutefois, dans les différentes études mentionnées ci-haut, aucune n'a investigué si ces kinases contribuent à la β -sélection [392-394]. Par contre, l'équipe de Owen en 1996 a montré que l'introduction *in vitro* d'une forme constitutivement active de MEK1 dans des thymocytes de souris *Rag-I^{-/-}* entraîne un développement thymique complet [401]. De plus, ils ont aussi démontré que ERK1/2 sont activées suivant le traitement *in vitro* de thymocytes *Rag-I^{-/-}* avec de l'anti-CD3 [401]. Ensuite, l'équipe de Zúñiga-Pflücker utilisa un système pour introduire différents plasmides rapporteurs dans des lobes thymiques et ceci permit pour la première fois d'étudier les signaux générés par le pré-RCT dans un thymus intact [402]. Ainsi, ils ont pu démontrer directement que le pré-RCT et la signalisation ERK1/2 sont couplés *in vivo* [402]. Finalement, la création de souris *Erk1^{-/-}; Erk2^{fllox/Lck-cre}* par l'équipe de Hedrick a permis de démontrer officiellement que ces deux MAPK sont importantes seulement pour la prolifération induite par la β -sélection puisque sans elles, les thymocytes réussissent à se différencier en DP RCT^{int} [398].

Un autre rôle a été attribué à ERK1/2 et c'est celui de promouvoir l'engagement vers la lignée SP CD4⁺. Effectivement, il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs solubles de la voie des MAPK dans des FTOC entraîne une altération du développement SP CD4⁺, alors que la production de SP CD8⁺ est intacte [355, 359, 403]. Au contraire, l'expression d'un transgène codant pour une forme constitutivement activée de ERK2 a montré une augmentation de la production des SP CD4⁺ [359]. Des études subséquentes ont aussi montré que la durée de la signalisation des ERK1/2 peut influencer l'engagement vers une lignée plutôt que vers une autre [404-406]. Finalement, l'équipe de Hedrick a démontré, avec la souris conditionnelle ERK2-déficiente, que cette MAPK n'est pas requise pour un engagement définitif, mais plutôt aide à la progression des thymocytes vers la lignée SP

CD4⁺ [398]. Malgré tout, le mécanisme par lequel ERK2 intervient pendant ce processus demeure indéfini.

Kinases JNK : rôle dans la sélection négative

L'identification d'un rôle pour les kinases JNK dans la sélection négative provient de plusieurs études. Entre autre, l'injection de cytochrome c chez des souris Tg, exprimant un RCT spécifique pour le cytochrome c, croisées avec des souris surexprimant un mutant dominant-négatif de JNK1, a montré que l'inhibition de la signalisation JNK résulte en une augmentation de la résistance des thymocytes DP à la sélection négative [407]. De plus, la même équipe a observé que l'injection *in vivo* d'anti-CD3 induit l'activité des kinases JNK chez les thymocytes [407]. Aussi, il a été démontré que les thymocytes d'une souris JNK2-déficientes traités *in vitro* avec de l'anti-CD3 sont résistants à l'apoptose [408]. En 2005, il a été montré que la kinase MINK, préalablement identifiée pour son rôle dans la sélection négative, active les voies des kinases JNK et p38 [409]. Toutefois, le mécanisme par lequel les kinases JNK seraient sollicitées pendant la sélection négative demeure indéfini.

Kinases p38: rôles dans la transition DN3-DN4 et dans la sélection négative

L'analyse de l'activité kinase de p38 chez des thymocytes de souris normales a montré que cette dernière est détectée abondamment chez les DN et un peu plus faiblement chez les DP [410, 411]. En utilisant un inhibiteur pharmacologique de p38, Sugawara et al. ont observé une diminution de la sélection négative, sans aucun effet sur la sélection positive, chez des FTOC de souris Tg RCT HY [412]. Ensuite, il a été montré que la surexpression d'une forme catalytiquement inactive de p38 chez la lignée cellulaire de thymocytes Thy278/107 entraîne une altération dans la transition DP-SP *in vitro* [413]. De plus, l'équipe de Flavell a démontré que la délétion des DP, normalement observée suivant l'administration *in vivo* d'anti-CD3, est altérée chez une souris MKK6-déficiente (kinase qui active p38) [414]. Toutefois, la contribution exacte de p38 à la suppression des thymocytes auto-réactifs n'est pas encore établie. De plus, bien que le rôle de p38 pour la

sélection négative soit reconnu, son rôle lors de la sélection positive demeure controversé [410, 415, 416].

p38 est activé *in vivo* dans les DN3 et est inactivé aussitôt que ces cellules sont différenciées en DN4 [410, 411]. En utilisant une souris Tg dans laquelle une forme constitutivement active de MKK6 est exprimée, l'équipe de Rincon a montré *in vivo* que l'abolition de la voie p38 entre les étapes DN3 et DN4 entraîne un arrêt du développement à l'étape DN3 [410]. De plus, il a été montré que l'activation de p38 chez les DN3 est dépendante de la présence de DSB générés pendant le réarrangement V(D)J du RCT β [417]. Aussi, p38 phosphoryle et active p53, ce qui induit le point de contrôle G₂/M chez les thymocytes DN3 dans le but de faciliter la réparation de leur ADN [417]. Une étude récente a montré que p38 peut phosphoryler et inactiver directement le Ser 389 de GSK3 β et ainsi activer la voie des β -caténines [418]. Les auteurs ont aussi souligné que la phosphorylation de la Ser 389 de GSK3 β est surtout observée au niveau du cerveau et chez les thymocytes, ce qui suggère que l'activation de la voie β -caténines en DN3 pourrait être réalisée par p38 au moment du réarrangement V(D)J [418]. Actuellement, aucun défaut au niveau du développement thymique n'a été reporté chez les souris déficientes pour les isoformes p38 β , p38 δ , p38 γ et p38 γ /p38 δ [419, 420].

ERK5: une participation à la sélection négative

L'équipe de Winoto a utilisé deux systèmes différents pour montrer que ERK5 joue un rôle lors de la sélection négative [421]. Premièrement, ils ont montré que l'apoptose chez les DP est réduite par l'incorporation d'une construction rétrovirale surexprimant une forme dominante-négative de MEK5, la kinase qui active ERK5, à l'intérieur de cultures de thymus réaggrégés (*re-aggregate thymic organs culture* ou RTOC) [421]. Deuxièmement, ils ont observé le même phénomène, mais *in vivo*, en reconstituant des souris irradiées de façon létale avec de la moelle de souris Tg RCT F5 préalablement infectée avec la construction MEK5 dominant-négatif, qu'ils ont ensuite traitées avec le peptide agoniste

correspondant [422]. Aussi, ils ont montré que ERK5 est activé rapidement et transitoirement suivant l'induction du RCT *in vitro* et que cette MAPK régule l'expression des facteurs Nur77 et Nor-1 impliqués dans la sélection négative [332, 421, 422].

MAPK non-conventionnelles et développement des LT

Finalement, concernant les MAPK non-conventionnelles, aucun défaut de développement thymique n'a été observé chez la souris *Nrk*^{-/-} et aucune étude n'a été reportée à ce jour sur le rôle de ERK3, ERK4 ou ERK7 dans le développement des LT [113].

3. La biologie des lymphocytes T périphériques

Deux types de LT naïfs, les LT CD8⁺ cytotoxiques et les LT CD4⁺ auxiliaires, sortent du thymus et patrouillent les tissus lymphoïdes périphériques en attente de rencontrer un agent étranger [423]. En général, les LT CD8⁺ ont la capacité d'éliminer les cellules qui ont été infectées par des virus qui vivent dans leur cytosol et elles présentent un fragment peptidique de ces agents étranger en association avec une molécule de classe I du CMH (CMHI) [423]. Le rôle des LT CD4⁺ est plutôt d'activer d'autres cellules et ces derniers se répartissent en au moins 3 classes fonctionnelles définies : les LT CD4⁺ T_H1, qui activent les macrophages pour tuer les bactéries intra vésiculaires qu'ils hébergent, les LT CD4⁺ T_H2 ou LT auxiliaires, qui activent les LB pour produire des anticorps et les LT CD4⁺ T_H17 qui régulent la réponse inflammatoire [423, 424]. Les antigènes qui activent les LT CD4⁺ sont ceux complexés à un CMHII et ils proviennent soit des compartiments vésiculaires des CPA (DC, LB et macrophages) ou soit de l'environnement extracellulaire [425, 426].

Bien que les LT nouvellement formés soient immunotolérants, ils conservent un certain potentiel de réactivité, ce qui leur permet de survivre en tant que LT naïfs et d'être plus sensibles aux antigènes étrangers (Ag) [427]. Une fois activés par ces Ag, les LT naïfs vont proliférer massivement pendant plusieurs jours et vont acquérir des fonctions effectrices qui

leur permettront d'éliminer efficacement l'agent concerné [428]. Une fois ce dernier anéanti, la plupart des cellules effectrices vont mourir et faire place à une petite fraction de LT, appelés LT mémoires (LTm), qui auront la capacité de survivre très longtemps et de répondre très rapidement si le même agent étranger est rencontré à nouveau. Plusieurs signaux et mécanismes sont nécessaires au maintien de la survie et de l'homéostasie de LT naïfs et aussi au déroulement efficace de leur activation, prolifération et de leur différenciation lors de la rencontre avec des Ag. Différentes informations disponibles sur ces sujets qui sont en lien avec ce travail de thèse seront survolées dans le présent chapitre.

3.1 Survie et homéostasie des LT naïfs

Les LT naïfs prolifèrent très peu puisque moins de 20% de ces derniers se divisent sur une période de 5 semaines [429]. En général, les LT naïfs ont une durée de vie considérablement longue qui est principalement dépendante des signaux provenant de l'environnement extérieur [429-431]. Plus spécifiquement, leur survie requière une combinaison de signaux provenant d'interactions constantes avec les complexes CMH/peptides du soi et avec l'IL-7 [432-436]. Lorsque la signalisation de l'un de ces deux pré-requis est abolie, la vie du LT est fortement écourtée [437, 438]. Effectivement, il a été montré à l'aide de différentes expériences, telles que la greffe de FTOC normaux dans un hôte *CmhII^{-/-}; Rag-2^{-/-}*, l'induction de la perte d'expression du RCT ou encore l'abolition des tyrosines kinases proximales du RCT, Fyn et Lck, qu'une altération de la signalisation induite via le RCT entraîne irrémédiablement la mort précoce des LT naïfs [432, 439-444]. De plus, il a été démontré qu'empêcher le contact entre l'IL-7 et le LT naïf, que ce soit en transférant des LT dans un hôte IL-7-déficient ou encore en injectant de l'anticorps anti-IL-7 dans une souris normale, écourte aussi la vie des LT naïfs [433, 434, 445, 446]. Au contraire, la surexpression d'IL-7 ou l'expression d'une forme constitutivement active de STAT-5, un facteur de transcription régulé par les cytokines possédant la chaîne commune γ_c , entraîne une augmentation de la taille du réservoir des LT naïfs [447-449]. En plus, il a

été montré que l'IL-15 joue aussi un rôle important dans la survie, mais seulement chez les LT CD8⁺ naïfs [450, 451].

Les signaux de survie induits grâce à l'interaction IL-7/IL-7R sont bien définis. Effectivement suivant l'activation du récepteur à l'IL-7, les kinases Jak1 et Jak3 liés au CD127 ainsi qu'à la chaîne γ_c , respectivement, sont activées [452-454]. Ceci permet le recrutement et l'activation de STAT5a et de STAT5b qui vont alors former un dimère et migrer au noyau pour réguler la transcription des gènes requis pour la survie des LT naïfs [455]. Aussi, l'IL-7 fait augmenter l'expression de Bcl-2 et Mcl-1, ce qui permet d'inhiber la voie intrinsèque d'apoptose [456-461]. De plus, ces deux molécules anti-apoptotiques régulent l'activité des effecteurs de mort cellulaire Bax et Bak [462, 463]. Aussi, Bcl-2 et Mcl-1 empêche Bim et Bid de lier et activer Bax et Bak et interagissent en plus avec d'autres membres de la famille *BH3-only*, tels que Bad et PUMA [464]. Finalement, d'autres molécules que les cytokines sont aussi requises pour induire la survie des LT naïfs, telles que le facteur de transcription LKLF dont l'expression serait induite par l'IL-2 et l'IL-7, et aussi, plus spécifiquement pour la survie des LT CD4⁺ naïfs, Runx1 qui est important pour réguler l'expression du CD127 [465-467].

3.2 Signalisation intracellulaire des LT périphériques

Activation, prolifération et différenciation cellulaire

Dès leur sortie du thymus, les LT CD8⁺ naïfs sont prédestinés à devenir des cellules T cytotoxiques et ceci, même si elles n'expriment pas encore aucune fonction effectrice qui caractérise les LT CD8⁺ différenciés. Tel que mentionné plus haut, les LT CD4⁺ naïfs peuvent se différencier soit en T_H1, en T_H2 ou en T_H17 et ces trois populations de LT CD4⁺ diffèrent au niveau du type de cytokines qu'elles sécrètent, ainsi que dans leurs fonctions. Puisque les MAPK ne jouent aucun rôle dans le contexte des cellules T_H17, cette population cellulaire ne sera plus abordée dans le présent travail. Les cellules T_H1

produisent de l'IFN- γ et du TNF- β , qui sont requis pour les réactions cellulaires engendrés par l'inflammation, et les T_H2 secrètent de l'IL-4, IL-5, IL-10 et de l'IL-13, qui entraînent l'activation et la différenciation des LB [468]. Ce sont les facteurs environnementaux, tels que la nature des cytokines avoisinantes, la dose d'antigène et la source de co-stimulation au moment de la rencontre entre l'APC et le LT CD4⁺ naïf qui déterminera vers quelle population se différenciera ce dernier [469]. Par exemple, la présence d'IL-4 pendant l'activation entraînera une différenciation vers la lignée T_H2, alors qu'en présence d'IL-12 et d'IFN- γ , le LT CD4⁺ deviendra un T_H1 [470-472]. L'activation des LT CD8⁺ peut se faire de deux différentes façons : il peut être activé directement par une APC présentant un antigène ou encore, son activation peut requérir un troisième joueur qui est une cellule T_H2. En plus des signaux provenant du RCT, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ requièrent un second signal pour être pleinement activés. Ce signal de co-stimulation est fourni par les protéines de la famille B7 exprimées par les APC [473]. Ces dernières lient le CD28 qui est exprimé chez les LT et la combinaison de tous ces signaux induit l'expansion clonale des LT [474-478]. L'induction de la prolifération est en plus dépendante d'OX40, 4-1BB, LFA-1 et CD2 [479-482]. L'activation de CD28 est aussi requise pour protéger la cellule de l'apoptose pendant sa prolifération massive via la production de Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1 et A1 [229, 238, 483-486]. Les signaux émis à l'intérieur de la cellule via ces différentes interactions vont mener à plusieurs changements tels que l'engagement dans le cycle cellulaire, la réceptivité aux signaux de stimulation émis par l'IL-2R et l'induction de la production de différents facteurs, tels que l'IL-2 [487]. Une fois activés, les LT vont éliminer l'agent étranger et une fois leur devoir accompli, ils vont mourir rapidement pour rétablir l'équilibre dans le nombre de LT et aussi pour enrayer les LT activés qui pourraient continuer à sécréter des cytokines, ce qui deviendrait alors toxique pour l'organisme. Pour s'assurer que ces cellules soient éliminées, leur apoptose est régulée par plusieurs voies de signalisation incluant les voies extrinsèques d'apoptose et c'est principalement Bim qui en est responsable [488-491] □ Toutefois, sous certaines conditions, telles que lors de la privation de glucose ou en

Ensuite, LAT recrute SLP-76 à la membrane et ce dernier recrute à son tour la phospholipase $C\gamma$ qui est alors activée par les kinases Tec [494, 495]. Trois voies de signalisation sont alors activées : les deux premières sont la voie NF κ B et la voie NFAT (Figure 15) [494, 497]. La troisième voie est générée par l'activation de la petite protéine G Ras qui une fois activée, induit la phosphorylation de la cascade des MAP kinases, ce qui a comme conséquence finale l'activation de différents facteurs de transcription, tels que AP-1 (Figure 15) [391]. Ensembles, les différents facteurs de transcription initient l'activation de la transcription de nouveaux gènes qui entraînent la différenciation, la prolifération et les fonctions effectrices des LT. Par exemple, NFAT active le gène de l'IL-2, une des cytokines importante à la prolifération étendue des LT activés [498, 499].

3.3 Les MAPK et les lymphocytes T périphériques

En plus de participer au développement thymique, plusieurs MAPK ont aussi été identifiées comme importantes pour l'activation et la fonction des LT matures. La prochaine section traitera des différentes fonctions attribuées à chaque groupe de MAPK chez les LT périphériques (Figure 16).

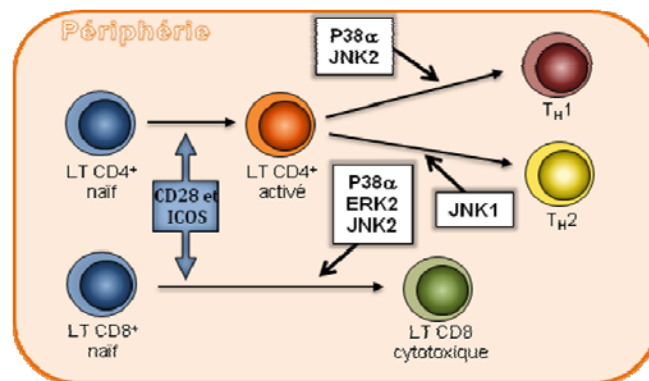


Figure 16: Les MAPK chez les LT périphériques

Les MAPK conventionnelles jouent des rôles importants au cours de l'activation, de la survie et de la différenciation des LT $CD4^+$ et des LT $CD8^+$. Voir le texte qui suit pour les détails et explications. Inspiré de [391].

ERK1/2: seule ERK2 régule la prolifération et la survie des LT CD8⁺

L'engagement du RCT mène au recrutement d'une multitude de molécules vers la surface interne de la cellule, telles que les protéines adaptatrices SLP-76 et Grb2 qui vont à leur tour activer la voie ras-MEK-ERK1/2 (Figure 15) [500]. Plusieurs études ont été menées pour découvrir le rôle de ces deux MAPK dans la biologie des LT périphériques et ce n'est que récemment que leur contribution exacte a été dévoilée. Au départ, il a été démontré que les inhibiteurs de MEK1/2 entravent la prolifération des LT matures *in vitro* [501]. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MEK1, a résulté en une inhibition presque totale de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ *in vitro* [502]. Certaines équipes ont essayé de démontrer la contribution individuelle de ERK1, mais cela a généré des résultats contradictoires au niveau de l'activation et de la prolifération des LT CD4⁺ [503, 504]. Récemment, l'équipe de Hedrick a montré que les LT CD8⁺ *Erk1*^{-/-} stimulés *in vitro* survivent et prolifèrent normalement [505]. Toutefois, ils ont démontré que ERK2 est absolument requise pour la prolifération cellulaire des LT CD8⁺, mais seulement en absence de co-stimulation [505]. De plus, ils ont montré que ERK2 est aussi requise pour la survie des LT CD8⁺ activés *in vivo* puisqu'elle régule l'expression de Bcl-2, Bcl-X_L et Bim [505]. Actuellement, le rôle de ERK1/2 dans l'activation des LT CD4⁺ demeure controversé.

Kinases JNK : JNK1 et JNK2 sont requis pour la différenciation des LT

Il a été montré qu'en plus de l'activation du RCT, la signalisation via la molécule de costimulation CD28 est requise pour activer et phosphoryler les kinases JNK chez les LT [506]. Effectivement, une stimulation anti-CD3 en absence de co-stimulation entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de *Jnk1* et de *Jnk2*, ainsi que l'augmentation de leur forme protéique, mais l'activation des kinases JNK requière en plus de l'anti-CD28 [506, 507]. De plus, il a été montré que contrairement aux LT CD4⁺ naïfs, leurs effecteurs T_H1 et T_H2 contiennent de hauts niveaux d'ARNm et de protéines de cette MAPK [508].

Par quels mécanismes les signaux provenant du RCT régulent les différentes isoformes JNK est un sujet controversé. Par exemple, bien qu'un rôle ait été proposé pour la calcineurine et la protéine kinase C thêta (PKC Φ), une autre étude a montré que la PKC Φ n'est pas requise pour l'activation des JNK1/2 chez les LT [509, 510]. De plus, comment les signaux provenant de l'activation de CD28 s'intègrent à ceux du RCT pour contrôler les voies des kinases JNK est aussi une question sans réponse définitive. Toutefois, cette intégration de signal pourrait impliquer la coopération de Syk et Rac [511]. Effectivement, une étude dans laquelle une forme dominante négative de Rac a été utilisée a permis de démontrer que cette dernière est requise pour l'activation des voies JNK et p38 chez les LT [512].

L'équipe de Flavell a créé en 1998 une souris JNK2-déficiente afin d'étudier le rôle de cette MAPK dans la différenciation des LT [508]. Ils ont montré que cette dernière est requise pour la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en effecteurs T_H1, mais ne l'est pas pour la différenciation en T_H2 [508]. De plus, ils ont observé que la voie JNK est activée seulement chez les T_H1 suivant une stimulation antigénique et que la production d'IFN- γ est significativement réduite chez les cellules T_H1 *Jnk2*^{-/-} [508]. JNK1 semble plutôt être un régulateur négatif de l'expression des cytokines T_H2, puisque la production d'IL-4 et d'IL-5 ainsi que la différenciation en T_H2 sont dramatiquement augmentées chez les souris *Jnk1*^{-/-} [513]. Le rôle des kinases JNK chez les LT CD8⁺ diffère de celui chez les LT CD4⁺. En effet, l'abolition de *Jnk2* entraîne une prolifération incontrôlable des LT CD8⁺ *in vitro* qui résulte d'une augmentation dans la production d'IL-2 [514]. Au contraire, les LT CD8⁺ *Jnk1*^{-/-} prolifèrent faiblement *in vitro* et produisent peu d'IL-2 [514]. Cette altération de la prolifération chez les LT CD8⁺ *Jnk1*^{-/-} n'est pas la conséquence d'une déficience dans la production d'IL-2, mais plutôt une altération dans l'expression de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α) [514]. Pour appuyer ces résultats, il a été observé *in vivo* que les LT CD8⁺ *Jnk1*^{-/-} prolifèrent faiblement suivant une infection avec le virus LCMV [515]. De plus, les LT CD8⁺ *Jnk1*^{-/-} présentent d'autres phénotypes spécifiques tels qu'une

diminution des fonctions T cytotoxiques et la réduction de l'expression de T-bet, d'éomesodermine et de la perforine [516].

p38 est requise pour la différenciation et la survie des LT effecteurs

La régulation de p38 chez les LT est différente de celle observée chez les deux autres groupes de MAPK discuté ci-haut. Effectivement, p38 peut être activée chez les LT CD4⁺ suivant l'induction du RCT, mais son activation complète requière des interactions avec d'autres récepteurs, tels que le CD28, 4-1BB, ICOS et Fas, en plus de certaines cytokines, telles que IL-12, IL-18, TNF- α [517]. Toutefois, la contribution relative de chacun de ces stimuli pour la régulation de p38 durant l'activation et la différenciation des LT demeure inconnue. L'utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques, ainsi que certaines souris manipulées génétiquement ont permis de démontrer que p38 est impliqué dans la différenciation des LT CD4⁺ en cellules T_H1 effectrices et dans la production d'IFN- γ [518]. De plus, il a été démontré chez des souris Tg exprimant une forme dominante négative de p38, que cette dernière est requise pour la production d'IFN- γ par les LT CD8⁺ activés [519]. Aussi, il a été montré que l'activation de p38 *in vivo* à l'aide de l'expression Tg d'une forme constitutivement active de MKK6 entraîne la mort sélective des LT CD8⁺ [519]. Il semble que p38 joue un rôle dans la mort induite par Fas chez les LT CD8⁺ puisque l'interaction avec Fas active p38, ce qui corrèle avec une diminution de Bcl-2 et de Bcl-X_L et une activation des caspases 9 et 3 [520]. Au contraire, toujours suite à une interaction avec Fas, l'inhibition de p38 empêche l'activation de la caspase 3 et par conséquent, diminue l'apoptose des LT CD8⁺ [520].

ERK5: un rôle dans la biologie des LT?

Les rares études qui se sont penchées sur l'attribution d'un rôle potentiel pour ERK5 dans la biologie des LT périphériques ont générées des résultats contradictoires. Premièrement, trois différentes études ont montré que ERK5 peut être activé via la

signalisation du RCT [521-523]. De plus, certaines équipes ont montré que la voie de signalisation ERK5 active l'expression des gènes *Nur77* et *Klf2* chez les LT [61, 523]. Finalement, une équipe a utilisé un siRNA inhibant ERK5 dans des hybridomes de cellules T, ainsi que dans des LT de ganglions lymphatiques pour montrer que ERK5 est requis pour le maintien de l'expression de CD62L chez les LT activés [523]. Par contre, récemment, il a été démontré que les niveaux de *Nur77* suivant l'activation du RCT ne sont pas affectés par l'absence de ERK5 dans un modèle de souris déficientes conditionnelle pour ERK5 [524]. De plus, aucune altération ne fut observée chez les LT périphériques de cette souris déficiente conditionnelle pour ERK5 [524].

Rôle des MAPK non-conventionnelles dans la biologie des LT

Finalement, concernant les MAPK non-conventionnelle NLK, ERK4 et ERK7, rien n'est connu à ce jour sur un rôle potentiel pour ces dernières dans la biologie des LT périphériques. Toutefois, ERK3 a été identifié dans une étude dont le but était d'identifier les kinases essentielles pour l'activation des LT [525]. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé une banque de rétrovirus contenant des cDNA exprimant des éléments supprimant l'expression de différentes kinases, avec laquelle ils ont infectés des cellules T Jurkat [525]. Ces cellules ont ensuite été stimulées et celles n'exprimant pas le CD69 ont été triées et les kinases associées identifiées. Ainsi, ERK3 fut identifié et associé à l'activation des LT.

4. Hypothèse

Tel que présenté dans l'introduction, les MAPK conventionnelles jouent des rôles importants au cours du développement thymique, ainsi que dans la biologie des LT périphériques. Au contraire, aucune MAPK non-conventionnelle n'a encore été identifiée comme participant dans une et/ou l'autre de ces deux différents épisodes dans la vie d'un LT. Puisque le développement des LT est principalement caractérisé par des étapes de différenciation et de prolifération cellulaire et que selon les informations disponibles, ERK3

pourrait participer aux événements de différenciation cellulaire, nous avons entrepris au départ de cette thèse d'évaluer la contribution de ERK3 dans le développement des LT. Aussi, simultanément, nous avons évalué la contribution de ERK3 dans l'activation des LT périphériques. **L'hypothèse principale de cette de thèse est donc que ERK3 régule les phénomènes de prolifération et/ou de différenciation chez les thymocytes et/ou chez les LT périphériques.** Les objectifs spécifiques se divisent en deux selon le sous-projet. Concernant le rôle de ERK3 pendant le développement des LT : (i) caractériser l'expression de ERK3 durant le développement des LT ; (ii) évaluer l'impact d'une déficience en ERK3 sur le développement des LT; (iii) déterminer la fonction de ERK3 au cours du développement des LT. Concernant le rôle de ERK3 dans l'activation des LT périphériques les objectifs sont : (i) caractériser l'expression de ERK3 chez les LT naïfs et activés; (ii) évaluer l'impact d'une déficience en ERK3 sur l'activation des LT; (iii) déterminer la fonction de ERK3 dans l'activation des LT. Dans cette thèse, les résultats sont présentés sous forme d'articles en préparation pour soumission prochaine.

Résultats

Article I. RAG-dependent accumulation of DNA double-strand breaks in CD4⁺CD8⁺ thymocytes in the absence of the MAP kinase ERK3

**Miriam Marquis^{1,2}, Benjamin Turgeon^{3,5}, Justine Rousseau^{3,5}, Matthias Gaestel⁶,
Sylvain Meloche^{3,5,7} and Nathalie Labrecque^{1,2,4,7}**

¹Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Departments of ²Microbiology and Immunology, ³Pharmacology and Molecular Biology and ⁴Medicine, and ⁵Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, University of Montreal, Quebec, Canada.

⁶Medical School of Hannover, Institute of Biochemistry, Hannover, Germany.

Running title: ERK3 regulates T cell development

Ma contribution spécifique dans cet article a été d'effectuer toutes les expériences sauf celles qui ont consisté à détecter la forme protéique de ERK3 (western blot : Article I, Figures 1C et 2A). Ces dernières ont été réalisées par Benjamin Turgeon et Justine Rousseau. De plus, j'ai réalisé tous les croisements de souris nécessaires, procédé à l'analyse de tous les résultats et participé activement à la rédaction de l'article en collaboration avec ma directrice de recherche Nathalie Labrecque. Aussi, Benjamin Turgeon a créé la souris *Erk3^{-/-}* et Justine Rousseau, la souris *Erk4^{-/-}*. Sylvain Meloche nous a gracieusement offert tous les modèles animaux et a participé activement à différentes discussions liées au projet, ainsi qu'à la révision de cet article.

Cet article est soumis dans EMBO

SUMMARY

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family of unknown function. To decipher its role, we evaluated T cell development in deficient mice. ERK3 ablation leads to a 50% reduction in CD4⁺CD8⁺ (DP) thymocyte number and to a block in CD4⁺ T cell development. Hematopoietic chimeras revealed that DP thymocyte phenotype is T-cell autonomous, while abrogation of CD4⁺ thymocyte development requires ERK3-deficiency in both thymocytes and thymic epithelium. We further show that the reduction in DP thymocyte number is the direct consequence of RAG-dependent accumulation of DNA double-strand breaks (DSBs). Unexpectedly, in thymocytes ERK3 function is independent of MK5, his only known interacting partner. Our results showed that like conventional MAPKs, ERK3 plays essential, but distinct, roles during T cell development.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are evolutionarily conserved serine/threonine kinases that play key roles in transducing extracellular cues into a wide variety of cellular responses¹. Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical member of the MAPK family which displays ~45% homology to the classical MAPKs ERK1/ERK2 in the kinase domain². Despite the similarity of their catalytic cores, several properties of ERK3 set it apart from ERK1/ERK2 and other classical MAPKs (Fig. 1a). First, ERK3 has only a single phosphorylation site in its activation loop instead of the conserved dual-phosphorylation motif Thr-Xxx-Tyr of classical MAPKs. Second, ERK3 contains a long C-terminal extension rich in serine/threonine of unknown function³. These structural differences suggest that upstream regulation of ERK3 activity and downstream targeting of substrates are likely to involve mechanisms different than with other family members. Consistent with this idea, none of the known MAPK kinases are able to phosphorylate and activate ERK3, and the events controlling ERK3 activity are still largely unknown. Unlike classical MAPKs, ERK3 is constitutively phosphorylated in the activation loop even in unstimulated cells⁴.

Recently, ERK3 was shown to interact with the MAPK-activated protein kinase 5 (MK5) leading to phosphorylation and activation of MK5^{5, 6}. Moreover, this interaction stabilizes ERK3 and excludes both ERK3 and MK5 from the nucleus^{5, 6}. ERK3 ablation only reduces MK5 activity by 50%⁵. The remaining MK5 activity is due to the closely related atypical MAPK, ERK4, which is also able to associate with MK5^{7, 8}. Unfortunately, the identification of MK5 as a binding partner of ERK3 did not reveal any possible biological role of ERK3 since the function of MK5 is still unresolved^{9, 10}.

The physiological functions of ERK3 remain to be established but accumulating evidence point for a role in differentiation. For example, ERK3 transcripts are upregulated during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells into neuronal or muscle cells². ERK3 protein also markedly accumulates during differentiation of C2C12 myoblasts into

muscle cells¹¹. Notably, overexpression of ERK3 in fibroblasts causes G₁ cell cycle arrest, suggesting a possible role in cell cycle control¹¹.

T cell generation in the thymus is a complex biological process that combines differentiation, proliferation, death, selection, and lineage commitment. Early thymic progenitors (ETPs) seed the thymus where they commit to the T-lineage to generate $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells¹². The most immature thymocytes are double negative (DN) thymocytes lacking CD4 and CD8 expression. The two first developmental stages (DN1 and DN2) involved proliferation to expand the rare committed T cell progenitors. Then, proliferation stops at the DN3 stage to allow TCR β rearrangement since RAG-2 is unstable in proliferating cells¹³⁻¹⁵. If TCR β rearrangement is successful, DN3 cells express the pre-TCR that will transmit concomitant survival, proliferation and differentiation signals (β -selection). This generates actively dividing DN4 cells that further differentiate into double-positive (DP) thymocytes¹⁶. At this stage, proliferation stops for TCR α locus rearrangement and conventional TCR expression starts. Since TCR rearrangement is random, DP thymocytes undergo an educational process to allow the survival of cells expressing a useful TCR restricted to self-MHC molecule while thymocytes expressing an auto-reactive TCR are eliminated¹⁷. These DP cells further differentiate into CD4⁺ or CD8⁺ single positive (SP) thymocytes, depending on their MHC specificity, and exit as naive T cells into the peripheral lymphoid organs¹⁷.

DP thymocyte differentiation can be divided into three steps based on TCR expression level. Newly generated DP thymocytes do not express the TCR (TCR^{low}) and are actively rearranging the TCR α locus to generate a functional TCR α chain. At this developmental stage, DNA double-strand breaks (DSBs) are generated by RAG-1 and RAG-2. These DNA DSBs have to be repaired correctly by non-homologous end joining (NHEJ) to generate the TCR α chain coding sequence^{18, 19} and to maintain genomic integrity²⁰. This requires DP TCR^{low} thymocyte survival for long enough to complete rearrangement. This is helped by their resistance to the Atm-dependent death pathway²¹

involved in sensing DNA DSBs. However, a DNA damage response clearly occurs in thymocytes since the RAG-mediated DSBs lead to histone H2AX phosphorylation^{22, 23} and, in absence of a functional NHEJ pathway, to p53-dependent checkpoint activation^{23, 24}. Sensing of these DNA DSBs is essential to allow for their repair and to avoid oncogenic translocation if the DSB persists^{18, 23, 25}. It is still unknown how DP thymocytes regulate the DNA DSB response to allow survival during rearrangement and to promote death if DNA DSB persists¹⁸. If DP thymocytes rearrange successfully the TCR α locus, they express intermediate TCR levels (TCR^{int}) and test TCR specificity. At this stage, TCR α locus rearrangement continues if the DP thymocyte is not positively selected. If positive selection occurs, DP thymocytes up-regulate TCR expression (TCR^{hi}) and continue maturation to the SP stage.

Given the important roles of other MAPK family members in T cell development and the possible role of ERK3 in differentiation, we hypothesized that ERK3 may participate in the control of thymocyte proliferation and/or differentiation. We show that in the absence of ERK3, the number of DP thymocytes is decreased by 50% and CD4SP thymocyte generation is abrogated. Hematopoietic chimeras revealed that the reduction in DP thymocyte number is T cell autonomous, while abrogation of CD4SP thymocyte development requires ERK3-deficiency in both thymocytes and thymic epithelium. We further show that the reduction in DP thymocyte number is the direct consequence of RAG-dependent accumulation of DNA double-strand breaks (DSBs). Our results show that ERK3 controls unique steps of thymocyte development.

RESULTS

ERK3 expression during thymic differentiation

To evaluate the role of ERK3 during thymic differentiation, we characterized its expression profile in thymocyte subsets using knock-in mice in which the *Erk3* coding sequence is replaced by the LacZ reporter (Turgeon B et al, manuscript submitted). To identify cells transcribing *Erk3*, we measured β -galactosidase activity using the fluorescent substrate fluorescein digalactopyranoside (FDG). *Erk3* transcription starts at the DN1 stage and increases up to the DN4 stage of thymocyte differentiation (Fig. 1b). The transcription of *Erk3* at the DP stage is lower than in the DN subsets and further decreased in SP thymocytes (Fig. 1b). Since ERK3 protein has a very short half-life in proliferating cells¹¹, we evaluated if *Erk3* transcription leads to a detectable level of ERK3 protein in thymocytes. ERK3 protein was detected in total thymus, DN and DP thymocyte extracts (Fig. 1c).

Reduced thymic cellularity and lack of CD4SP thymocytes in the absence of ERK3

The ERK3 expression profile led us to evaluate the impact of ERK3 ablation on thymocyte differentiation. *Erk3*^{-/-} mice die within 24h after birth (Turgeon B et al, manuscript submitted), limiting analysis to thymus from newborn mice. We confirmed the absence of ERK3 protein in *Erk3*^{-/-} newborn thymus (Fig. 2a). Thymus from wild-type and knock-out mice were removed at birth before animal death to analyze T cell development. DN and DP thymocytes were present in similar percentage in *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} thymi, but CD4SP thymocyte differentiation was abrogated in *Erk3*^{-/-} thymus (Fig. 2b). At birth, CD8SP thymocytes are not apparent yet in wild-type thymus, which preclude studies on ERK3 function in these cells (Fig. 2b). The early steps of thymocyte differentiation in *Erk3*^{-/-} mice occurred normally as shown by the distribution of DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44^{lo}CD25⁺) and DN4 (CD44⁻CD25⁻) subsets (Fig. 2c). Interestingly, thymic cellularity was reduced by 50% in the absence of ERK3 (Fig. 2d).

This is apparent in all thymocyte subsets but only statistically significant for DN1, DP and CD4SP thymocytes (Fig. 2d,e). These results show that ERK3 influences thymic cellularity by decreasing DP thymocyte number, and suggest that ERK3 is necessary for CD4SP thymocyte differentiation.

Defective thymocyte differentiation in fetal thymic organ cultures (FTOCs)

To rule out the possibility that defective thymocyte differentiation in *Erk3*^{-/-} newborn mice was due to their smaller size or their moribund status, we analyzed T cell differentiation in FTOCs. Fetal thymic lobes from E14.5 embryos are similar in size (not shown) and cellularity (Fig. 3a). After 5 days of culture, DN, DP and CD8SP thymocytes were present in similar percentages in *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} FTOCs but CD4SP thymocytes were reduced in *Erk3*^{-/-} cultures (Fig. 3b). As observed in newborn thymus, *Erk3*^{-/-} FTOCs exhibit a 50% reduction in cellularity (Fig. 3c). The decrease was statistically significant for DP and CD4SP thymocytes (Fig. 3d). These results argue that defective thymocyte differentiation in the absence of ERK3 is due to a thymus intrinsic effect and not to the health status of *Erk3*^{-/-} mice. Moreover, these results suggest that ERK3 is necessary for CD4SP but not CD8SP thymocyte differentiation.

Loss of ERK3 does not affect ETP number

The decreased number of DN1 cells in *Erk3*^{-/-} newborn thymus and the reduction of DP thymocytes in both *Erk3*^{-/-} newborn thymus and FTOCs led us to evaluate if ETPs express ERK3 and if they seed the thymus normally in *Erk3*^{-/-} mice. The DN1 subset is heterogeneous and contains ETPs, the earliest T cell progenitor of the thymus^{12, 26, 27}. A reduction in ETP number could explain the overall decrease thymic cellularity observed in *Erk3*^{-/-} mice. Moreover, the number of ETPs correlates directly with thymic size²⁸. We showed that ETPs (lin⁻CD117⁺CD25⁻) transcribe *Erk3* (Supplementary Fig. 1) and that similar ETP numbers were found in *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice (Fig. 3e,f). Thus, the reduction

of DN1 and DP thymocytes in the absence of ERK3 is not the consequence of a decrease in ETPs.

DP thymocyte generation from ERK3-deficient ETPs is normal

The decreased DP thymocyte number in ERK3-deficient mice could result from a reduced rate of their generation from ETPs. To test this, we sorted ETPs from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice and plated them on OP9-DL1 cells²⁹ to allow their *in vitro* differentiation into DP thymocytes. Similar percentage and number of DP thymocytes were generated from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} ETPs after 9 days of differentiation (Fig. 3g). Altogether, this indicates that the decreased DP thymocyte number is not due to impaired generation from ETPs.

Increased DP thymocyte proliferation and apoptosis in *Erk3*^{-/-} mice

The reduced number of DP thymocytes in *Erk3*^{-/-} thymus could result from decreased thymocyte proliferation during the DN4 to DP transition or from increased DP thymocyte apoptosis. To evaluate thymocyte proliferation, we injected BrdU in female mice at day 18.5 of gestation and collected the embryos 1h later to measure the number of cells in S phase. There was no difference in BrdU incorporation in *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} DN1 to DN4 thymocytes (Fig. 4a). Moreover, BrdU incorporation was similar in ISP thymocytes (Fig. 4b), the differentiation stage between DN4 and DP. Unexpectedly, DP thymocytes from *Erk3*^{-/-} mice showed an increased proliferation rate (Fig. 4b,c). Furthermore, this increased proliferation was present in DP thymocytes expressing low, intermediate and high TCR levels (Supplementary Fig. 2a). Similar results were obtained when analyzing the cell cycle with 7AAD staining (Supplementary Fig. 2b). Therefore, the reduction of DP thymocyte number in *Erk3*^{-/-} mice cannot be explained by decreased proliferation after β -selection since DN3, DN4 and ISP thymocytes proliferate similarly. The increased BrdU incorporation in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes seems at odd with a two-fold decrease in their number. This can be reconciled by the fact that the number of proliferating thymocytes is similar in both *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice (Fig. 4c). This suggests that non-dividing DP

thymocytes are preferentially lost in the absence of ERK3. To address this, we evaluated if apoptosis was increased in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes using a terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling (TUNEL) assay on *ex vivo* thymocytes. There was no significant difference in the percentage of TUNEL-positive DP cells between *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice (Fig. 4d). A more detailed analysis showed that TUNEL-positive cells were markedly increased in positively selected DP TCR^{hi} thymocytes (Fig. 4d,e). Since TCR^{hi} DP thymocytes represent a small fraction of thymocytes, their increased apoptosis rate cannot explain the two-fold reduction in thymocyte number. Therefore, we asked whether thymocyte subsets (DN3, DN4 and ISP) giving rise to DP thymocytes were more prone to apoptosis, but no difference could be observed (Supplementary Fig. 3a). Our inability to detect differences in DP thymocyte apoptosis might be explained by the rapid engulfment of apoptotic cells by thymic resident macrophages. To address this, we assessed thymocyte apoptosis after 48h of *in vitro* culture, but again we could not observe any difference between *Erk3*^{-/-} and *Erk3*^{+/+} thymocytes (Supplementary Fig. 3b).

To further understand the reduction in DP thymocyte number, we monitored the expression of pro-survival and pro-apoptotic molecules known to be expressed by thymocytes. There was no difference in the expression of *Bim*, *Puma* and *Bcl-x_L*, but ERK3-deficient DP thymocytes showed a two-fold increase in *Noxa* expression (Fig. 4f). This suggests that increased *Noxa* expression may contribute to the induction of *Erk3*^{-/-} DP thymocyte death.

DNA DSB accumulation in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes

While analyzing *Erk3*^{-/-} DP thymocytes, we noticed a decrease percentage of cells expressing intermediate (TCR^{int}) TCR levels; 55% of *Erk3*^{+/+} DP thymocytes are TCR^{int} while it decreases to 45% in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes (Fig. 5a,b). This reduced TCR expression does not result from defective TCRβ chain production since *Erk3*^{-/-} thymocytes express the same amount of intracellular TCRβ chain (not shown). The decreased

expression of the TCR was not associated either with a change in *Tcra* transcription (Fig. 5c). These observations led us to investigate if DNA DSBs were accumulating in ERK3-deficient cells. To test this possibility, we assayed the presence of phosphorylated histone H2AX, a sensitive marker of DNA DSBs³⁰⁻³². We found that two times more *Erk3*^{-/-} DP thymocytes were positive for phospho-H2AX, suggesting that ERK3 is necessary for DSB repair or for the elimination of cells bearing DSBs (Fig. 5d). Importantly, DP thymocytes are the only subset that displays an increase in phospho-H2AX, as no difference was observed in DN and SP thymocytes (Fig. 5d). Phosphorylated H2AX was increased in DP thymocytes expressing low, intermediate and high TCR levels (Fig. 5e). This suggests that *Erk3*^{-/-} DP thymocytes are defective in repairing DNA DSBs.

The accumulation of phospho-H2AX and DNA DSBs can occur either via RAG-induced DSBs or via other types of genotoxic stress such as replication fork collapse which generates DNA DSBs³³. The later is a likely possibility since DP thymocytes are generated after a wave of proliferation¹⁶. To address if DNA DSBs accumulation in DP thymocytes were RAG-mediated, we crossed *Erk3*^{-/-} mice to RAG-2-deficient mice. These mice were also TCR transgenic to bypass the differentiation block at the DN3 stage that occurs in absence of RAG-2. Expression of the rearranged OT-I or OT-II TCR in the absence of RAG abolished the accumulation of phospho-H2AX in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes (Fig. 5f) and, importantly, restored thymic cellularity (Fig. 5g). These results indicate that DNA DSB accumulation and reduced thymic cellularity is a direct consequence of RAG-mediated rearrangement in *Erk3*^{-/-} mice. This suggests that ERK3 is required for proper repair of DNA DSBs.

Reduced thymic cellularity but not CD4SP thymocyte differentiation block is T cell autonomous

To circumvent ERK3-deficient mice lethality, fetal liver cells from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} E13.5 embryos were transferred into lethally irradiated mice. Thymocyte differentiation was normal in hematopoietic chimeras lacking ERK3 (Fig. 6a,b). In contrast to *Erk3*^{-/-}

newborn mice and FTOCs, CD4SP thymocyte differentiation was normal in *Erk3*^{-/-} fetal liver chimeras, suggesting that the absence of CD4SP thymocytes in *Erk3*^{-/-} mice is due to ERK3 inactivation in thymic epithelial cells. As in newborn mice, thymic cellularity was reduced by 50% in hematopoietic chimeras lacking ERK3 (Fig. 6c) with a significant reduction in DN1 and DP thymocytes (Fig. 6d,e). This suggests that the reduced thymic cellularity in *Erk3*^{-/-} mice is T cell autonomous and does not require ERK3 ablation in the thymic epithelium. Further characterization of DP thymocytes from hematopoietic chimeras showed decreased TCR expression, increased apoptosis of TCR^{hi} cells and accumulation of phospho-H2AX (Supplementary Fig.4).

ERK3 deficiency in thymic epithelium is not sufficient to abrogate CD4⁺ T cell development

Since CD4SP thymocyte development was normal in *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras while CD4⁺ T cell differentiation was abolished in *Erk3*^{-/-} newborn and FTOCs, we investigated if the inhibition of CD4SP thymocyte development was a result of ERK3 deficiency in the thymic epithelium. We first showed that *Erk3* is transcribed in thymic epithelial cells (not shown). Then, we grafted 2'-deoxyguanosine treated E14.5 *Erk3*^{-/-} thymic lobes under the kidney capsule of MHC class II-deficient mice (*Abb*^{-/-}). *Abb*^{-/-} mice were used to avoid entry of mature CD4 T cells produced by the recipient before the graft³⁴. CD4SP thymocyte development was normal when ERK3 expression was only abolished in thymic epithelial cells (Fig. 6f). This suggests that ERK3 deficiency in both thymocytes and thymic epithelial cells is required to impair CD4SP thymocyte differentiation.

MK5-independent function of ERK3 during thymocyte differentiation

Previous studies have shown that ERK3-MK5 interaction leads to the activation of MK5^{5, 6}. Therefore, we evaluated if the thymic phenotype of ERK3^{-/-} mice was a consequence of deficient activation of MK5. If this is the case, thymic differentiation in MK5 knock-out mice should phenocopy ERK3-deficient mice. As shown in Fig.7, thymic cellularity and

thymocyte development was normal in MK5-deficient mice suggesting that an MK5-independent function of ERK3 during thymocyte differentiation.

DISCUSSION

Our results identify the atypical MAPK ERK3 as a new regulator of T cell development. In mice lacking ERK3, DP thymocyte number is reduced two-fold in a T cell autonomous fashion. This reduction is not due to a decrease rate of generation from ETPs or defective proliferation after β -selection. In contrast, the increased BrdU incorporation by DP thymocytes is at odds with a decreased number of DP thymocytes. However, this can be easily reconciled if we preferentially lose non-dividing DP thymocytes in the absence of ERK3. Moreover, we carried out very short pulses of BrdU and in these conditions BrdU⁺ DP thymocytes probably represent newly generated DP from actively dividing DN4 thymocytes. Therefore, ERK3 is not necessary for the generation of DP thymocytes, thereby suggesting that it might be important for their survival. However, we could not observe massive *Erk3*^{-/-} DP thymocyte apoptosis using freshly isolated cells. Only the minor subset of DP TCR^{hi} thymocytes showed increased apoptosis but this cannot explain the two-fold reduction in *Erk3*^{-/-} DP thymocyte number. We hypothesize that we failed to detect apoptotic DP thymocytes because of their rapid engulfment by thymic resident macrophages³⁵. Although we could not detect a major change in apoptosis rate, we found that ERK3-deficient thymocytes express two-fold more of the pro-apoptotic effector Noxa, further suggesting that *Erk3*^{-/-} DP thymocytes die by apoptosis.

The accumulation of DNA DSBs in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes could be due to ineffective repair of RAG-mediated DNA DSBs during TCR α locus recombination or to other type of genotoxic stress that creates DSBs such as replication fork collapse³³. Our results clearly indicate that DNA DSBs accumulation in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes is mediated by RAG activity. Indeed, RAG-deficient TCR transgenic DP thymocytes lacking ERK3 expression do not accumulate DNA DSBs and have normal DP thymocyte number. Therefore, ERK3 deficiency leads to the accumulation of RAG-mediated DNA DSBs in DP thymocytes. This accumulation of RAG-induced DNA DSBs could occur via different mechanisms. First, it is possible that DNA DSB repair is defective in the absence of ERK3. Second, it is possible

that inactivation of ERK3 leads to sustained RAG expression. As a consequence, DP thymocytes would continuously rearrange the TCR α locus and accumulate DNA DSBs. We ruled out this possibility by analyzing RAG1/2 expression by real-time PCR in DP thymocytes (not shown). The accumulation of RAG-mediated DNA DSBs in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes is probably the primary event leading to the loss of these cells since these DNA lesions are highly genotoxic. We believe that the DNA damage response will sense the accumulation of these un-repaired DNA DSBs and signal the induction of DP thymocyte apoptosis. It is known that a p53-dependent damage checkpoint is activated by the accumulation of RAG-mediated DSBs in *Scid* thymocytes, deficient in NHEJ, and this checkpoint leads to thymocyte apoptosis²⁴. Therefore, we postulate that a similar mechanism leads to the *Erk3*^{-/-} thymocyte death due to accumulation of DNA DSBs. The upregulation of the pro-apoptotic effector Noxa by *Erk3*^{-/-} DP thymocytes is in agreement with the induction of a p53 death pathway³⁶⁻³⁸.

The increase in RAG-induced DNA DSBs is probably not a consequence of defective repair by NHEJ since we did not observe any accumulation of DNA DSBs in DN thymocytes that actively recombined the TCR β locus. This suggests that the NHEJ pathway is not defective in ERK3-deficient thymocytes. However, we cannot exclude that the NHEJ pathway is regulated differently at the DN and DP stages and that ERK3 signaling is important for proper NHEJ mediated-repair in DP thymocytes. Furthermore, it is intriguing that we do not see any accumulation of RAG-mediated DSBs during TCR β chain rearrangement. One possible explanation is that the TCR β locus cannot undergo multiple rounds of rearrangement due to its configuration and to the very efficient allelic exclusion mechanism that occurs following β -selection via the pre-TCR¹⁶. Therefore, we believe that DN3 thymocytes do not have time to accumulate DNA DSBs before undergoing β -selection.

Our results also suggest that ERK3 is not involved in the sensing of DNA DSBs since phospho-H2AX accumulates at these lesions. This also indicates that ATM activation is not

defective in our model since ATM phosphorylates H2AX^{23, 39, 40}. ATM controls a complex cascade of signaling events via the phosphorylation of different substrates, which leads to cell cycle checkpoint activation to allow repair of the lesion or to apoptosis if the DNA DSB is not repaired³⁹. Interestingly, it was shown that ATM deficiency in thymocytes does not lead to defective TCR α and β recombination^{23, 41}. However, ATM seems to be very important for DP thymocyte survival during TCR α locus recombination and to assure TCR α locus integrity^{23, 41}. In fact, ATM-deficient thymocytes successfully pass the β -selection checkpoint but are defective in the generation of TCR^{hi} and TCR^{int} DP thymocytes^{23, 41}. Therefore, a high proportion of ATM-deficient DP thymocytes die due to their inability to maintain TCR α locus integrity that is necessary to achieve successful rounds of TCR α rearrangement to express a functional TCR. The phenotype of ERK3-deficient thymocytes resembles that of *Atm*^{-/-} mice⁴¹ suggesting that ERK3 may share functions with ATM or be part of the same signaling pathway. The efficient H2AX phosphorylation in the absence of ERK3 indicates that ERK3 does not directly control the catalytic activity of ATM in thymocytes, but it is possible that both ATM and ERK3 contribute to the activation of a common target important for DP thymocyte maturation.

The partial phenotype in the absence of ERK3 suggests that another signaling effector may have a redundant function during thymocyte differentiation. A possible candidate is the paralogous MAPK ERK4, which shares high homology with ERK3³. However, we did not observe any defect in thymocyte differentiation in *Erk4*^{-/-} mice (not shown) or any aggravation of the phenotype in ERK3/ERK4 double-deficient mice (Supplementary Fig. 5). Furthermore, ERK4 expression is not detectable in thymocytes (not shown). Further studies are required to identify which protein allows for thymocyte differentiation in absence of ERK3. As discussed above, ATM or one of its downstream substrate are candidates.

Another important and unique role of ERK3 that was unveiled by our studies is the control of CD4SP thymocyte differentiation. Lack of ERK3 expression in thymocytes is not

sufficient to block CD4SP thymocyte development since these cells develop normally when ERK3 is lacking only in hematopoietic cells. This suggested that the absence of ERK3 in the thymic epithelium was responsible for the phenotype. It is intriguing that only CD4⁺ but not CD8⁺ T cell development was affected in the absence of ERK3. One simple explanation would be defective expression of MHC class II molecules by *Erk3*^{-/-} thymic epithelial cells, but our preliminary observations suggest that this is not the case (not shown). Thymic graft experiments under the kidney capsule clearly showed that *Erk3*^{-/-} thymic epithelium is able to support CD4SP differentiation when thymocytes are proficient for ERK3 expression. Therefore, CD4⁺ T cell differentiation blockade requires ERK3 deficiency in both thymocytes and epithelium. This suggests that ERK3 expression in thymocytes is providing an essential signal for proper maturation of thymic epithelial cells, which is necessary for normal differentiation of CD4SP thymocytes. It is possible that ERK3-deficient thymocytes lack expression of molecules that are involved in the thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk that controls maturation and maintenance of thymic epithelial cells⁴²⁻⁴⁴. We believe that ERK3 expression by thymocytes is more important to control thymic epithelial cell maturation than maintenance since CD4SP development which occurs normally in hematopoietic chimeras where a wild-type thymic epithelium is already formed. Further studies will aim to identify which signal is missing in *Erk3*^{-/-} thymocytes for proper function of thymic epithelial cells.

Previous studies have shown that MK5 is a physiological binding partner of ERK3 and that this interaction leads to MK5 activation^{5, 6} suggesting that ERK3 mediates some of its function via MK5. Our results clearly showed that MK5 is not involved in T cell development which indicates that in thymocytes ERK3-MK5 interaction is not physiologically relevant. Therefore, our results suggest that ERK3 controls thymic differentiation independently of MK5. Further studies should lead to the identification of new ERK3 targets.

Our results also highlight that ERK3 is not just another member of the ERK family since it has no redundant function with ERK1/2 during T cell development⁴⁵. Moreover, ERK3 controls unique thymocyte differentiation events suggesting that this atypical MAPK has evolved to assume different functions than conventional MAPKs.

In conclusion, we identified two novel and unique functions for ERK3 during T cell development. First, ERK3 expression in thymocytes is necessary to prevent the accumulation of RAG-dependent DNA DSBs in DP thymocytes. This suggests that ERK3 is an important regulator of the DNA DSB response and/or repair in thymocytes. Further biochemical characterization of ERK3 function should provide a deeper understanding of the mechanisms that control the physiological response to DNA DSBs, a key event to maintain genomic integrity. Second, ERK3 expression by thymocytes and thymic epithelial cells is essential for the differentiation of CD4⁺ T cells. This suggests that ERK3 expression by thymocytes is necessary for proper development or function of thymic epithelial cells. The identification of the role of ERK3 in this process may help design better strategies for immune reconstitution of immuno-compromised patients.

METHODS

Mice

ERK3- and MK5-deficient mice were generated as described⁶ (Turgeon B et al. manuscript submitted). ERK3 129/SvEv and ERK3 C57BL/6 heterozygous mice were bred under specific pathogen free conditions at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center in accordance with the Canadian Council of Animal Care. *Abb^{-/-}*, RAG-2-deficient OT-I and OT-II TCR transgenic mice were from Taconic^{46, 47}. These mice were bred to *Erk3^{+/-}* and inter-crossed to generate ERK3-deficient OT-I/RAG-2^{-/-} or OT-II/RAG-2^{-/-} mice. C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

Antibodies and flow cytometry

Anti-CD4 (L3/T4, CT-CD4), anti-CD25 (CL8925B, CL8925F and PC615.3), anti-CD8 (CL168, CL169B and CT-CD8a), anti-TCR β (CL7200B, H57-597), anti-CD3 (CT-CD3), anti-NK (DX5) antibodies were purchased from Cederlane Laboratories (Hornby, Ontario, Canada). Anti-CD8 (53-6.7), anti-CD44 (IM7), anti-BrdU (B44), anti-c-Kit and lineage cocktail antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Anti-TCR $\gamma\delta$ (UC7-13D5) was purchased from eBioscience. Stainings were done as previously described⁴⁸.

FDG staining

FDG staining was performed as described⁴⁹. Briefly, cells were surface stained and resuspended in PBS. Warmed FDG (7.5 mM) was added to cells while gently vortexing. The reaction was stopped by adding ice-cold PBS and cells were kept on ice for 5 min. After centrifugation, cells were resuspended in PBS supplemented with 10% horse serum and incubated at 15°C for 15-20 min to enhance β -galactosidase activity before flow cytometry analysis.

BrdU incorporation

Fetal liver chimeras (6-8 weeks post-reconstitution) or mice at 18.5 days of gestation were injected i.p. with 1 mg BrdU (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO). One hour later, thymocytes were stained for cell surface markers followed by fixation and permeabilization with BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) and staining with anti-BrdU or isotype control antibody.

Apoptosis analysis

Thymocytes were cell surface stained and fixed in 1% paraformaldehyde for 30 min on ice. Then thymocytes were permeabilized with 0.1% Tween 20, 1% BSA for 30 min on ice and incubated in TUNEL reaction mixture (Pharmingen Apo-Direct Kit, San Diego, CA) for 1 h at 37°C.

***In vitro* differentiation of ETPs**

14.5 days fetal thymus ETPs were sorted as lineage cocktail⁻, c-kit^{hi} and CD25⁻ and seeded at 10³ cells/well in 24-well tissue culture plates containing OP9-DL1 cells²⁹ supplemented with 1 ng/ml IL-7 and 5 ng/ml Flt3 ligand. Cells were cultured for 9 days before analysis.

Immunoblot analysis

Thymocytes were lysed in 50 mM Tris-HCL, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A and 1 % Triton (v/v) X-100 for 1 min at 4°C. Lysates were run on 7.5% SDS acrylamide gels and transferred to Hybond-ECL membranes (Amersham). Blots were probed with polyclonal anti-ERK3 (Cell Signaling, USA) , anti-β-actin (LabVision, CA, USA) or anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) antibody and subsequently with horseradish-peroxydase-

conjugated anti-rabbit IgG. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer LAB inc., MA, USA).

FTOC

Embryonic day 14.5 fetal thymic lobes were placed on the surface of 0.8 μm pore size Nuclepore Track-Etch membranes (Fisher Scientific, CA) and laid down on 2 ml of complete Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO) and incubated for 5 days at 37°C and 5% CO₂.

Real-Time PCR analysis

Thymocytes were sorted and RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). RNA was reverse transcribed and real-time PCR reaction was carried out on ABI Prism Sequence Detection System 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). The primer sequences are listed in Supplementary Table 1. All reactions were runned in triplicate and average values were used for quantification. *Hprt* was used as endogenous control.

Hematopoietic chimeras

2×10^6 fetal liver cells from day 13.5 embryos were injected i.v. into lethally irradiated (12 Gy) syngenic mice (5-7 weeks old). Mice were analyzed 6-8 weeks post-reconstitution.

Thymic grafting

Thymic lobes from 14.5 day embryos were cultured at 37°C as described for FTOC with 1.35 μM 2'-deoxyguanosine (Sigma-Aldrich) for 5 days to deplete hematopoietic cells⁵⁰. Individual lobes were loaded at the extremity of a cannula of an 18-gauge needle with saline and inserted under the kidney capsule of *Abb^{-/-}* mice.

Statistical analysis

Student's *t*-test and ANOVA were used for statistical analysis as indicated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Drobetsky and members of the laboratory for helpful discussion. We acknowledge C. Perreault and S. Lesage for critical reading of the manuscript. We thank N. Henley for cell sorting, C. Beauchamp and J. Rooney for technical assistance, M. Chagnon for statistical analysis and the staff of the Animal Facility for mouse care. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to N.L. and S.M. M.M was supported by the Cole Foundation and the University of Montreal. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling. N. Labrecque was supported by a CIHR New Investigator Award and currently holds a Senior Scholarship of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183 (2001).
2. Boulton, T.G. *et al.* ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675 (1991).
3. Coulombe, P. & Meloche, S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387 (2007).
4. Deleris, P. *et al.* Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocation of MK5. *J Cell Physiol* **217**, 778-788 (2008).
5. Seternes, O.M. *et al.* Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* **23**, 4780-4791 (2004).
6. Schumacher, S. *et al.* Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* **23**, 4770-4779 (2004).
7. Aberg, E. *et al.* Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**, 35499-35510 (2006).
8. Kant, S. *et al.* Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**, 35511-35519 (2006).
9. Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130 (2006).
10. Perander, M., Keyse, S.M. & Seternes, O.M. Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Front Biosci* **13**, 4617-4624 (2008).

11. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J. & Meloche, S. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 4542-4558 (2003).
12. Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H.T. & Zuniga-Pflucker, J.C. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* **26**, 678-689 (2007).
13. Lin, W.C. & Desiderio, S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2733-2737 (1994).
14. Hoffman, E.S. *et al.* Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* **10**, 948-962 (1996).
15. Rothenberg, E.V. & Taghon, T. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 601-649 (2005).
16. Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A. & Vilimas, T. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol Rev* **209**, 159-169 (2006).
17. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-176 (2003).
18. Bassing, C.H. & Alt, F.W. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**, 781-796 (2004).
19. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* **71**, 101-132 (2002).

20. Rooney, S., Chaudhuri, J. & Alt, F.W. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev* **200**, 115-131 (2004).
21. Bhandoola, A., Dolnick, B., Fayad, N., Nussenzweig, A. & Singer, A. Immature thymocytes undergoing receptor rearrangements are resistant to an Atm-dependent death pathway activated in mature T cells by double-stranded DNA breaks. *J Exp Med* **192**, 891-897 (2000).
22. Chen, H.T. *et al.* Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* **290**, 1962-1965 (2000).
23. Matei, I.R., Guidos, C.J. & Danska, J.S. ATM-dependent DNA damage surveillance in T-cell development and leukemogenesis: the DSB connection. *Immunol Rev* **209**, 142-158 (2006).
24. Guidos, C.J. *et al.* V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev* **10**, 2038-2054 (1996).
25. Callen, E., Nussenzweig, M.C. & Nussenzweig, A. Breaking down cell cycle checkpoints and DNA repair during antigen receptor gene assembly. *Oncogene* **26**, 7759-7764 (2007).
26. Porritt, H.E. *et al.* Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* **20**, 735-745 (2004).
27. Allman, D. *et al.* Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* **4**, 168-174 (2003).

28. Louis, I. *et al.* The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling. *Immunity* **29**, 57-67 (2008).
29. Schmitt, T.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749-756 (2002).
30. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868 (1998).
31. Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-916 (1999).
32. Ismail, I.H. & Hendzel, M.J. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* **49**, 73-82 (2008).
33. Branzei, D. & Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 297-308 (2008).
34. Michie, S.A., Kirkpatrick, E.A. & Rouse, R.V. Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus. *J Exp Med* **168**, 1929-1934 (1988).
35. Surh, C.D. & Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**, 100-103 (1994).
36. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058 (2000).
37. Shibue, T. *et al.* Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**, 2233-2238 (2003).

38. Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036-1038 (2003).
39. Shiloh, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**, 402-410 (2006).
40. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D.J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**, 42462-42467 (2001).
41. Matei, I.R. *et al.* ATM deficiency disrupts Tcr α locus integrity and the maturation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Blood* **109**, 1887-1896 (2007).
42. Shores, E.W., Van Ewijk, W. & Singer, A. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* **21**, 1657-1661 (1991).
43. van Ewijk, W., Shores, E.W. & Singer, A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* **15**, 214-217 (1994).
44. Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. & Bleul, C.C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LT β R. *J Exp Med* **198**, 757-769 (2003).
45. Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pages, G., Pouyssegur, J. & Hedrick, S.M. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* **23**, 431-443 (2005).
46. Hogquist, K.A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17-27 (1994).

47. Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* **76**, 34-40 (1998).
48. Lacombe, M.H., Hardy, M.P., Rooney, J. & Labrecque, N. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8⁺ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* **175**, 4400-4407 (2005).
49. Chan, S., Correia-Neves, M., Dierich, A., Benoist, C. & Mathis, D. Visualization of CD4/CD8 T cell commitment. *J Exp Med* **188**, 2321-2333 (1998).
50. Jenkinson, E.J., Franchi, L.L., Kingston, R. & Owen, J.J. Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur J Immunol* **12**, 583-587 (1982).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 ERK3 expression during thymocyte differentiation. **(a)** Schematic structures of ERK1/2 and ERK3. Black, kinase domain; grey, conserved region also found in ERK4; white, C and N-terminal extension. The residues of the activation loop phosphorylation motif within the kinase domain are shown. **(b)** ERK3 expression during thymocyte differentiation. Thymocytes from *Erk3*^{+/-} (thick line) and *Erk3*^{+/+} (thin line) mice were cell surface stained, permeabilized and submitted to FDG. Numbers indicate the percentage of FDG⁺ cells. Representative of 4 independent experiments. **(c)** ERK3 protein expression in thymocytes. Western blot analysis of ERK3 protein in lysates of total thymocytes (THY), DN and DP thymocytes from wild-type mice. GAPDH was used as loading control. Representative of 2 independent experiments.

Figure 2 Reduced cellularity and defective CD4SP thymocyte differentiation in *Erk3*^{-/-} newborn thymus. **(a)** Absence of ERK3 protein in *Erk3*^{-/-} thymus. Lysates of newborn thymocytes from *Erk3*^{+/+} (WT) and *Erk3*^{-/-} (KO) mice were blotted with a polyclonal anti-ERK3 antibody. Murine embryonic fibroblasts (MEFs) were used as controls. **(b)** Loss of ERK3 blocks CD4SP thymocyte differentiation. CD4/CD8 dot plots are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} newborn mice. The percentage of cells in the different thymocyte subsets is indicated on the dot plot. **(c)** Normal distribution of DN subsets in *Erk3*^{-/-} mice. CD44/CD25 dot plots gated on lineage negative cells are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} newborn thymus. The percentage of DN1 to DN4 cells is indicated on the profile. **(d)** Reduced number of DP and CD4SP thymocytes in the absence of ERK3. Cell numbers for the different thymocyte populations are shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) newborn mice. The bar represents the mean value; each dot represents one mouse. Statistical differences were determined by ANOVA. **(e)** Reduced DN1 thymocyte number in the absence of ERK3. Cell numbers for the different thymocyte populations are shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) newborn mice. The bar represents the mean value; each dot represents one mouse. Statistical differences were determined by ANOVA.

Figure 3 Defective thymocyte development in the absence of ERK3 is intrinsic to the thymus and is not due to inefficient ETP differentiation. **(a)** Similar cellularity of *Erk3*^{-/-} and *Erk3*^{+/+} E14.5 fetal thymus. **(b)** Impairment of CD4SP thymocyte differentiation in *Erk3*^{-/-} FTOCs. CD4/CD8 dot plots are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} FTOCs. The percentage of cells in the different subsets is indicated on the dot plot. **(c)** Reduced thymic cellularity in FTOCs from *Erk3*^{-/-} mice. The number of thymocytes recovered at the end of the culture is shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) FTOCs. Statistical differences were determined by ANOVA. **(d)** Reduced number of DP and CD4SP thymocytes in *Erk3*^{-/-} FTOCs. Cell numbers for the different thymocyte populations are shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) FTOCs. Statistical differences were determined by ANOVA. **(e)** No reduction of ETPs in the absence of ERK3. CD25/c-Kit profiles gated on lineage-negative cells are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} newborn thymus. Numbers indicate ETP percentage. **(f)** Normal number of ETPs in *Erk3*^{-/-} newborn mice. Numbers are shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) newborn mice. Each dot represents one mouse and the bar the mean value. **(g)** Normal generation of DP thymocytes from *Erk3*^{-/-} ETPs. *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} ETPs were cultured for 9 days on the OP9-DL1 cells. CD4/CD8 profiles are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} cultures. Cell recovery and the percentage of DP thymocytes are indicated on the dot plot.

Figure 4 Increased thymocyte proliferation and apoptosis in *Erk3*^{-/-} newborn mice. **(a)** Normal DN thymocyte proliferation in the absence of ERK3. Thymocytes were surface-stained followed by intracellular staining with anti-BrdU antibody (thick line) or isotype control (thin line). The histograms show BrdU incorporation by the different subsets of DN cells. Numbers indicate the percentage of BrdU⁺ cells. **(b)** Increased BrdU incorporation by *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. The overlays show anti-BrdU staining (thick line) and isotype control staining (thin line) for ISP, DP and CD4SP thymocytes from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice. **(c)** Quantification of DP thymocyte proliferation. The percentage (top) and the number (bottom) of BrdU⁺ DP thymocytes are shown. The bar represents the mean value;

each dot represents one mouse. **(d)** Increased apoptosis of positively selected DP thymocytes in the absence of ERK3. Histograms show TUNEL staining in total DP thymocytes (DP) and in TCR^{hi} DP thymocytes in the presence (top) or absence (bottom) of ERK3. Percentage of TUNEL⁺ cells is indicated on each histogram. **(e)** Quantification of DP TCR^{hi} thymocyte apoptosis. Percentage of TUNEL⁺ cells for the TCR^{hi} population is shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. Each dot represents one mouse and the bar shows the mean value. **(f)** *Noxa* overexpression by *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. Real-time PCR analysis of *Noxa*, *Bim*, *Puma* and *Bcl-xL* expression in *Erk3*^{-/-} relative to *Erk3*^{+/+} DP thymocytes.

Figure 5 Defective TCR expression and accumulation of DNA DSBs in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. **(a)** Decreased TCR expression in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. The overlays show TCR expression by *Erk3*^{+/+} (thin line) and *Erk3*^{-/-} (thick line) DP thymocytes. **(b)** Quantification of the percentage (top) and number (bottom) of TCR^{lo}, TCR^{int} and TCR^{hi} DP thymocytes. The bars represent the mean value and each dot represents one mouse. **(c)** Real-time PCR analysis of *Tcra* gene expression. Expression in *Erk3*^{-/-} relative to *Erk3*^{+/+} DP thymocytes is shown. **(d)** Accumulation of phosphorylated H2AX in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. Overlays show phospho-H2AX staining by *Erk3*^{+/+} (thin line) or *Erk3*^{-/-} (thick line) DN, DP (TCR^{lo}, TCR^{int} and TCR^{hi}) and CD4SP thymocytes from newborn mice. **(e)** Quantification of DNA DSBs in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. The percentage of phospho-H2AX positive cells in the different DP thymocyte subsets (TCR^{lo}, int and hi) is shown for *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) newborn mice. Each dot represents one mouse and the bar the mean value. Statistical significance was analyzed using Student's *t*-test. **(f)** RAG-dependent accumulation of DNA DSBs in *Erk3*^{-/-} DP thymocytes. Histograms show phospho-H2AX staining by DP thymocytes from *Erk3*^{+/+} (thin line) and *Erk3*^{-/-} (thick line) OT-II *Rag-2*^{-/-} newborn mice. **(g)** Restoration of thymic cellularity in the absence of RAG in *Erk3*^{-/-} mice. Thymic cellularity of OT-II/*Rag-2*^{-/-} (left) and OT-I/*Rag-2*^{-/-} (right) newborn mice proficient (+/+) or deficient (-/-) in ERK3 is shown.

Figure 6 Reduced thymocyte number and normal CD4SP thymocyte differentiation in ERK3-deficient hematopoietic chimeras. **(a)** Normal T cell differentiation in hematopoietic chimeras lacking ERK3. CD4/CD8 profiles are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras 8 weeks post-reconstitution. **(b)** Normal DN subset distribution in *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras. CD44/CD25 profiles gated on lineage-negative cells are shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras. Numbers indicate the percentage of cells in each subset. **(c)** Reduced thymic cellularity in *Erk3*^{-/-} fetal liver chimeras. The number of thymocytes recovered from *Erk3*^{+/+} (+/+) and *Erk3*^{-/-} (-/-) hematopoietic chimeras is shown. Each dot represents one mouse and the bar represents the mean value. Statistical differences were determined by ANOVA. **(d)** Reduced DP thymocyte number in *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras. The bar represents the mean value; each dot represents one mouse. Statistical differences were determined by ANOVA. **(e)** Reduced number of DN1 thymocytes in hematopoietic chimeras lacking ERK3. The bar represents the mean value; each dot represents one mouse. Statistical differences were determined by ANOVA. **(f)** Normal CD4SP thymocyte differentiation when ERK3 deficiency is restricted to thymic epithelial cells. *Erk3*^{-/-} and *Erk3*^{+/+} fetal thymus were cultured 5 days in 2'-deoxyguanosine and grafted under the kidney capsule of *Abb*^{-/-} mice. CD4/CD8 profile is shown for *Erk3*^{-/-} grafted thymus 8 weeks post-grafting. Numbers indicate the percentage of cells in each subset.

Figure 7 MK5-independent function of ERK3 during thymocyte differentiation. CD4/CD8 profiles are shown for *Mk5*^{+/+} and *Mk5*^{-/-} newborn mice. The percentage of cells in the different subsets is indicated on the dot plot. The total number of thymocytes recovered are shown for *Mk5*^{+/+} and *Mk5*^{-/-} mice. Representative of 2 independent experiments.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1 ETPs transcribed the *Erk3* gene. Thymocytes from 6 to 8 week-old *Erk3*^{+/-} (thick line) and *Erk3*^{+/+} (thin line) mice were surface-stained with the lineage cocktail of antibodies, anti-CD25 and anti-c-Kit antibodies. Cells were then permeabilized and submitted to the β -galactosidase substrate, FDG. FDG staining is shown after gating on ETPs (lin⁻CD25⁻c-Kit⁺). Number above the bracketed line indicates the percentage of FDG positive cells.

Figure S2 Increased proliferation of DP thymocytes in the absence of ERK3. **(a)** *Erk3*^{-/-} DP thymocytes expressing low, intermediate and high level of the TCR incorporate more BrdU. *Erk3*^{+/-} mice were intercrossed. At day 19 of gestation, females were injected with 0.1 mg of BrdU and sacrificed 1 h later to dissect thymic lobes. Thymocytes were surface-stained with anti-TCR β , anti-CD4 and anti-CD8 antibodies followed by intracellular staining with anti-BrdU antibody (thick line) or isotype control (thin line). The histograms show BrdU incorporation by the different subsets of DP thymocytes recovered from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice. Numbers above the bracketed lines indicate the percentage of BrdU⁺ cells. **(b)** Cell cycle analysis of *Erk3*^{-/-} thymocytes. Thymocytes from newborn mice were stained with 7AAD to evaluate their cell cycle profile. Histograms show 7AAD staining of *Erk3*^{+/+} (top) and *Erk3*^{-/-} (bottom) after gating on DN, DP and CD4SP thymocytes. The percentage of cells in G1, S and M phases is indicated on each histogram.

Figure S3 No detectable increase in apoptosis of thymocytes in the absence of ERK3. **(a)** *Ex vivo* analysis of thymocyte apoptosis. Thymocytes were collected from newborn *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice and were directly stained with Annexin V and 7ADD to measure apoptosis (Annexin V⁺ and 7AAD⁻) in the different thymocyte subsets. The histograms show Annexin V staining after gating on 7AAD negative cells isolated from *Erk3*^{+/+} (top) and *Erk3*^{-/-} (bottom) mice. **(b)** No detectable increase in apoptotic DP and CD4SP thymocytes

after 48 h of *in vitro* culture. Thymocytes from newborn *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice were cultured *in vitro* in complete RPMI media at 37°C for 48 h. Recovered thymocytes were stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies and with Annexin V and 7AAD to measure apoptosis (Annexin V⁺ and 7AAD⁻) in the different thymocyte subsets. The histograms show Annexin V staining after gating on 7AAD negative cells isolated from *Erk3*^{+/+} (top) and *Erk3*^{-/-} (bottom) mice.

Figure S4 DP thymocytes from *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras exhibit similar defects as *Erk3*^{-/-} newborn DP thymocytes. **(a)** Reduced TCR expression by DP thymocytes from *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras. Thymocytes from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras were surface stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-TCRβ antibodies. The overlays show TCR expression by *Erk3*^{+/+} (thin line) and *Erk3*^{-/-} (thick line) DP thymocytes from fetal liver chimeras. **(b)** Increased apoptosis of DP thymocytes expressing high level of the TCR in *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras. Cell suspensions from thymus of fetal liver chimeras were surface-stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-TCRβ antibodies followed by a TUNEL assay. Histograms show TUNEL staining in total DP thymocytes (DP) and in DP thymocytes expressing high level of the TCR (DP TCR^{hi}) in the presence (top) or absence (bottom) of ERK3. The percentage of TUNEL positive cells is indicated above the bracketed line on each histogram. **(c)** Accumulation of phospho-H2AX in DP thymocytes from *Erk3*^{-/-} fetal liver chimeras. Thymocytes from hematopoietic chimeras were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-TCRβ antibodies followed by intracellular detection of phospho-H2AX. Overlays show phospho-H2AX staining by *Erk3*^{+/+} (thin line) or *Erk3*^{-/-} (thick line) DP thymocytes expressing low (lo), intermediate (int) and high (hi) level of the TCR.

Figure S5 ERK4 does not compensate for the lack of ERK3 during thymic differentiation **(a)** T cell differentiation in FTOCs from ERK3 and ERK4 double-deficient mice. Thymus from E14.5 *Erk3*^{+/+}/*Erk4*^{+/+} and *Erk3*^{-/-}/*Erk4*^{-/-} fetuses were cultured for 5 days and thymocytes were then stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. CD4/CD8 dot plots

are shown for *Erk3*^{+/-}/*Erk4*^{+/-} and *Erk3*^{-/-}/*Erk4*^{-/-} FTOCs. The percentage of cells in the different thymocyte subsets are indicated on the dot plot. **(b)** Reduced thymic cellularity in FTOCs from ERK3-deficient mice is not aggravated in the absence of ERK4. FTOCs were generated as in A. The total number of thymocytes recovered at the end of the culture are shown for *Erk3*^{+/-}/*Erk4*^{+/-} (Dbl+/-) and *Erk3*^{-/-}/*Erk4*^{-/-} (Dbl-/-) FTOCs. **(c)** Loss of ERK4 does not further decrease the number of DP and CD4SP thymocytes in *Erk3*^{-/-}/*Erk4*^{-/-} FTOCs. FTOCs were generated as in A. Cell numbers for the different thymocyte populations were extrapolated from the percentage of each subset and the total number of thymocytes that were recovered in *Erk3*^{+/-}/*Erk4*^{+/-} (Dbl+/-) and *Erk3*^{-/-}/*Erk4*^{-/-} (Dbl-/-) FTOCs.

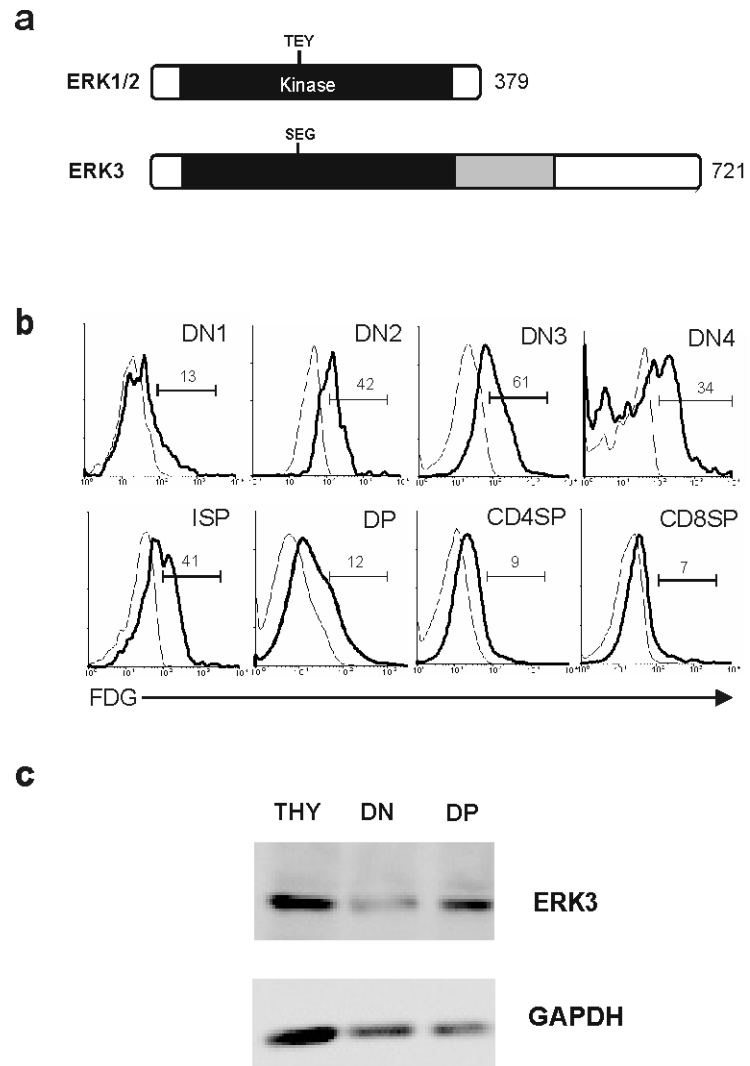
Figure 1

Figure 2

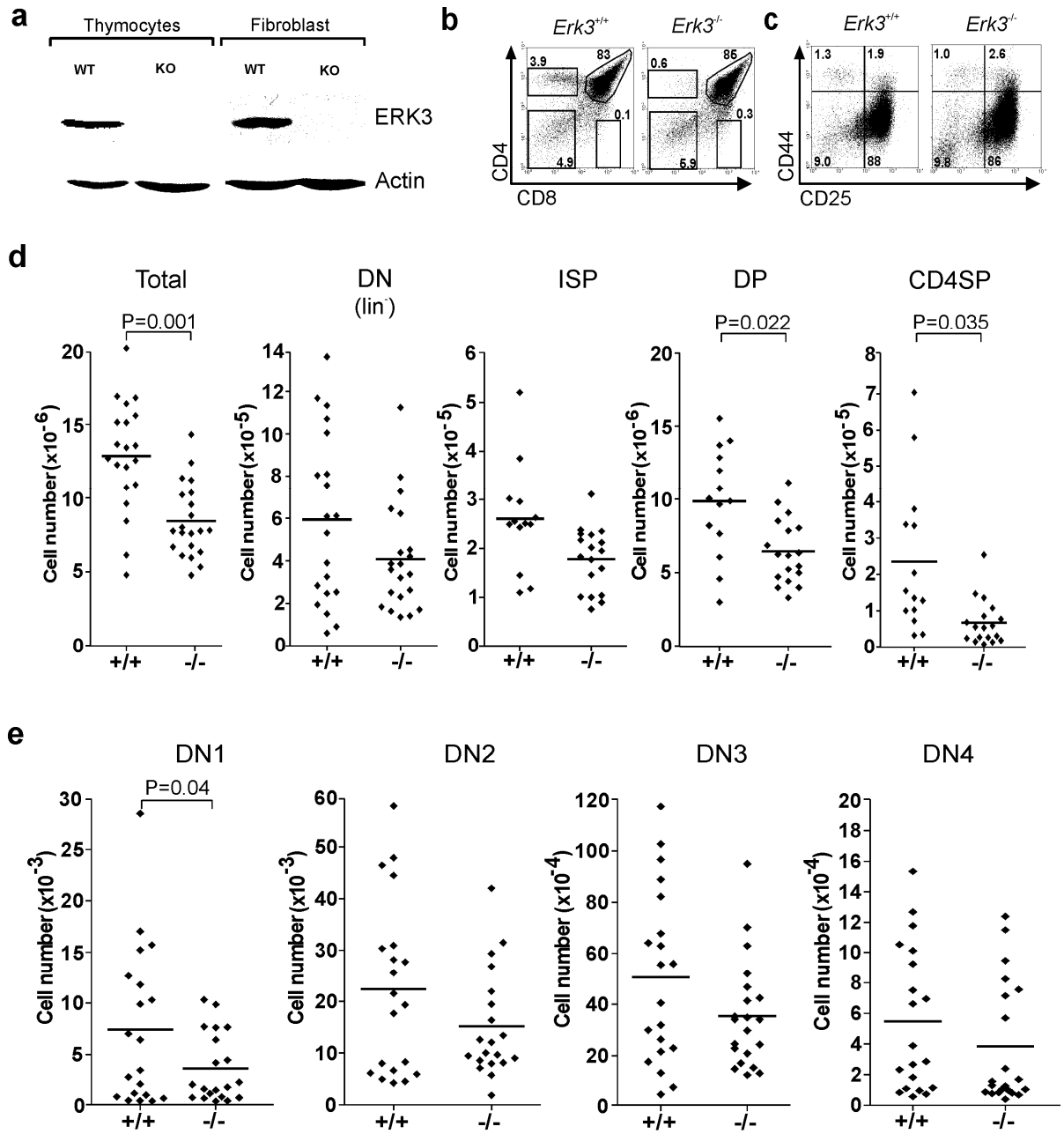


Figure 3

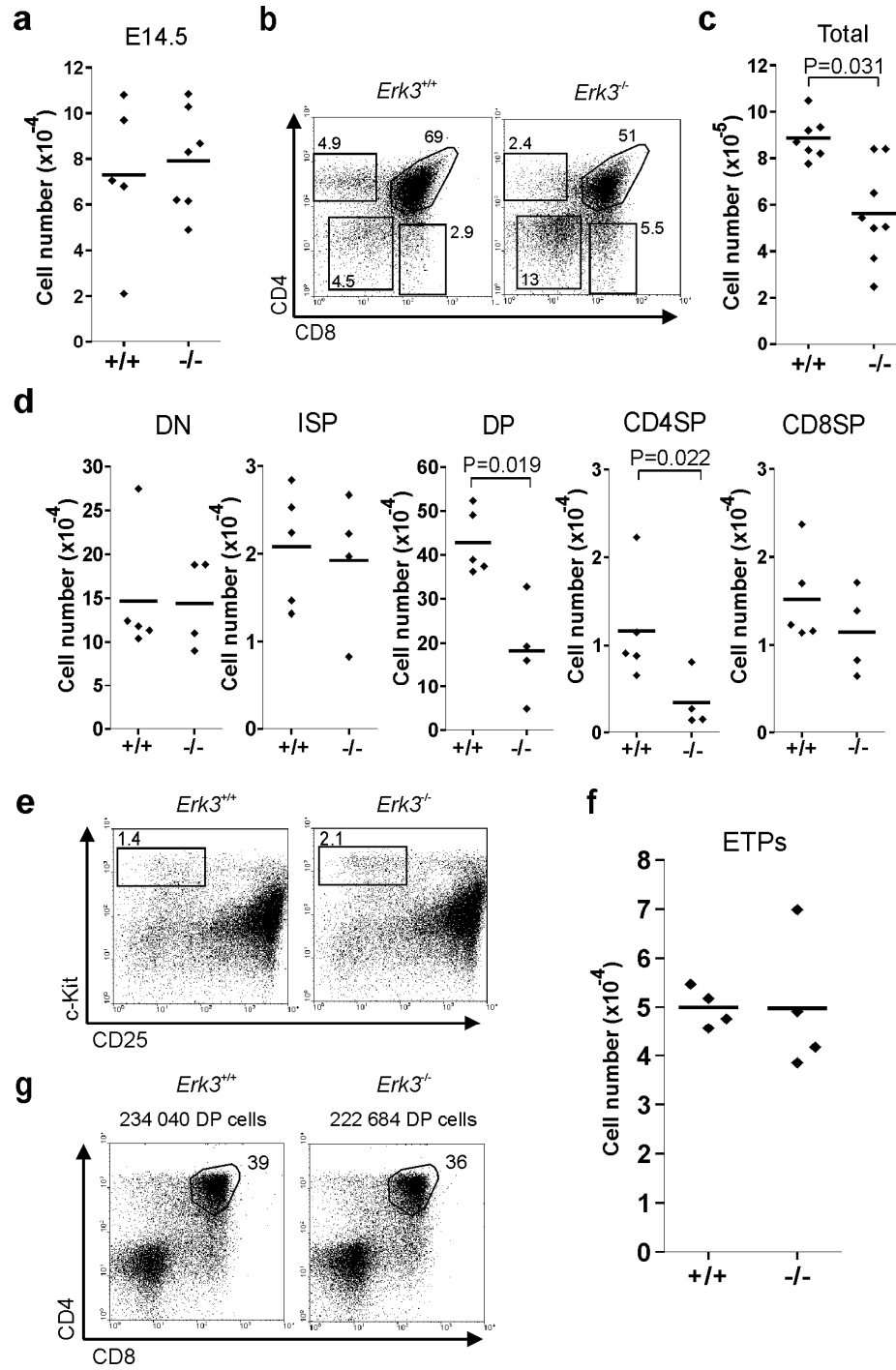


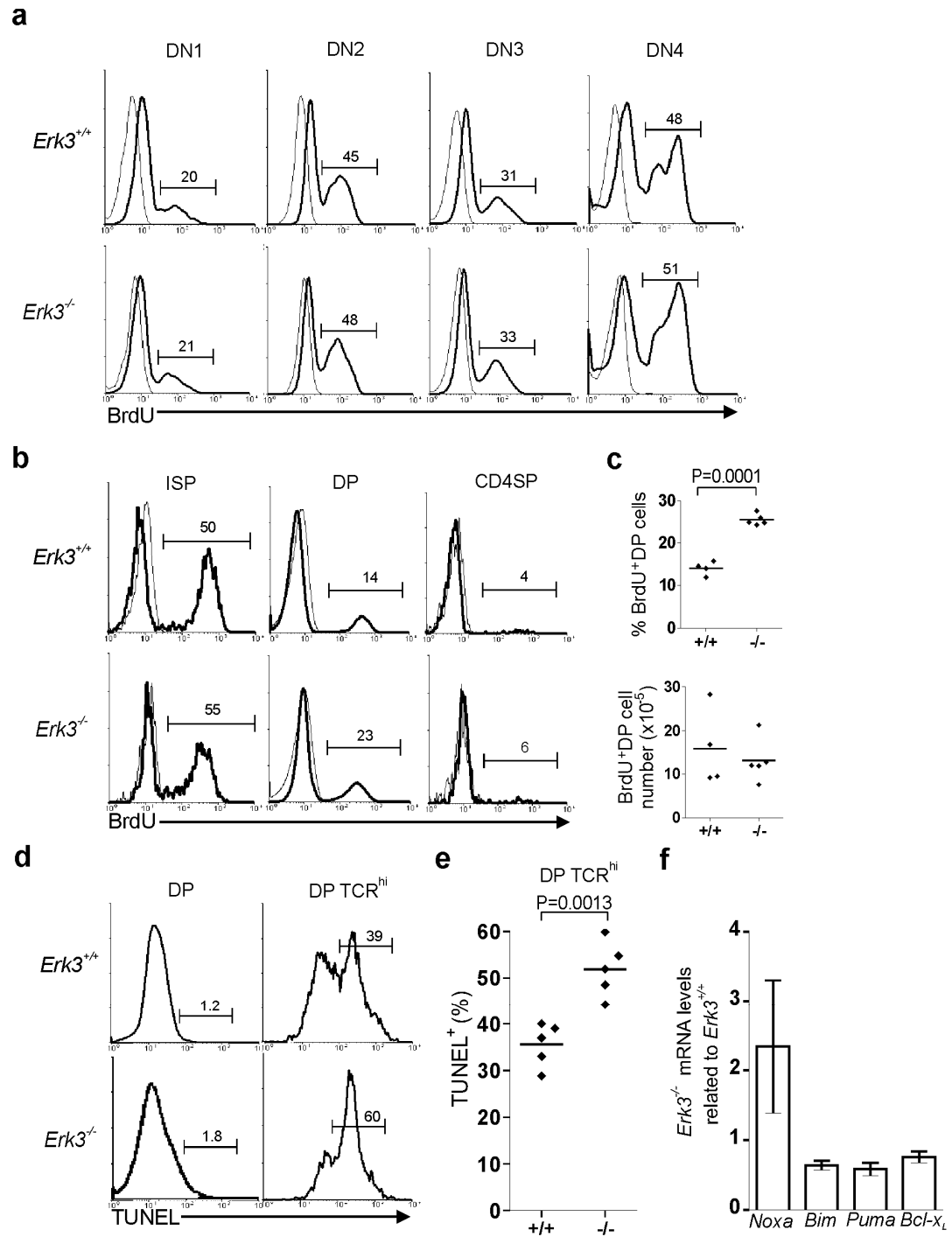
Figure 4

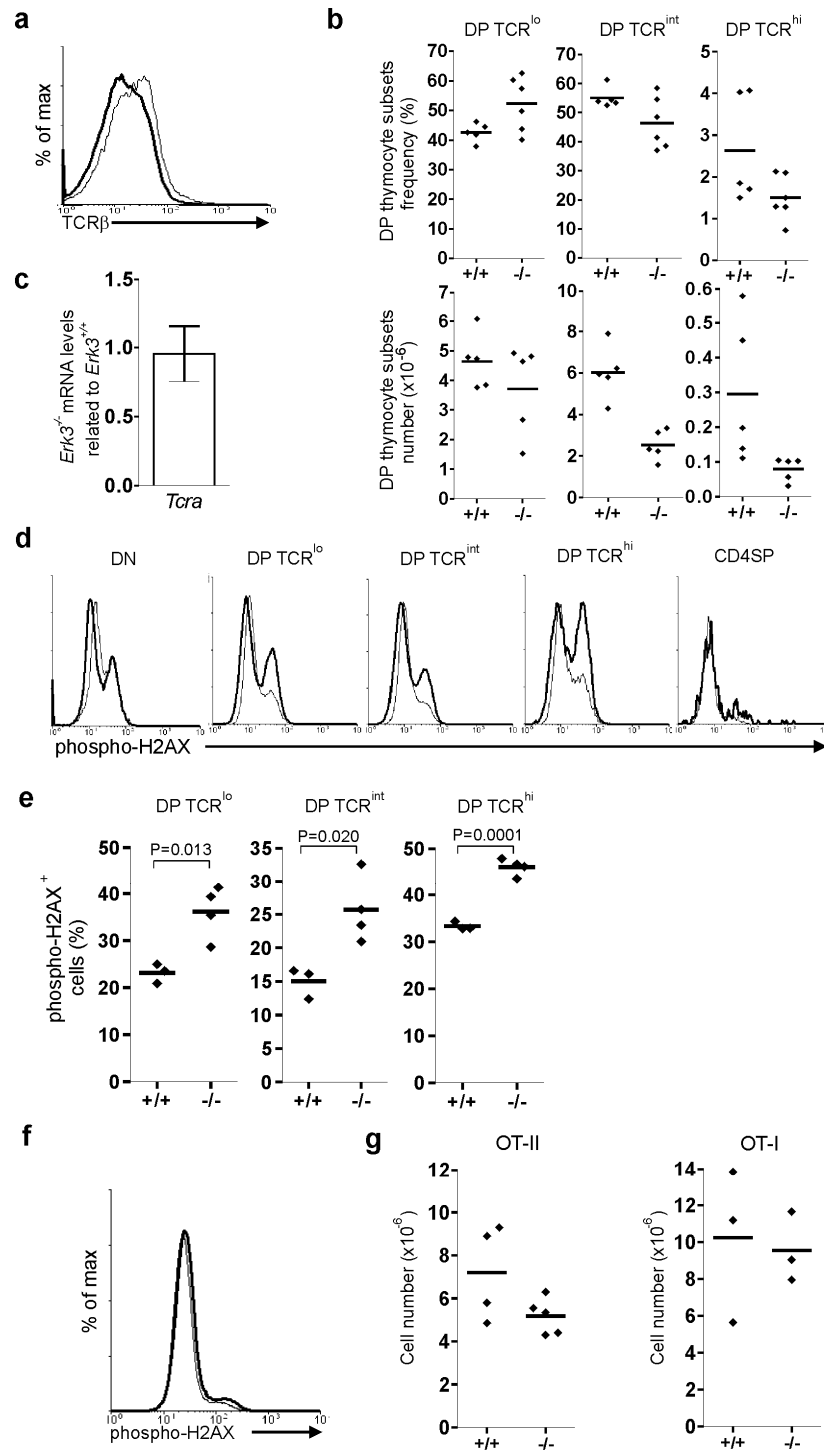
Figure 5

Figure 6

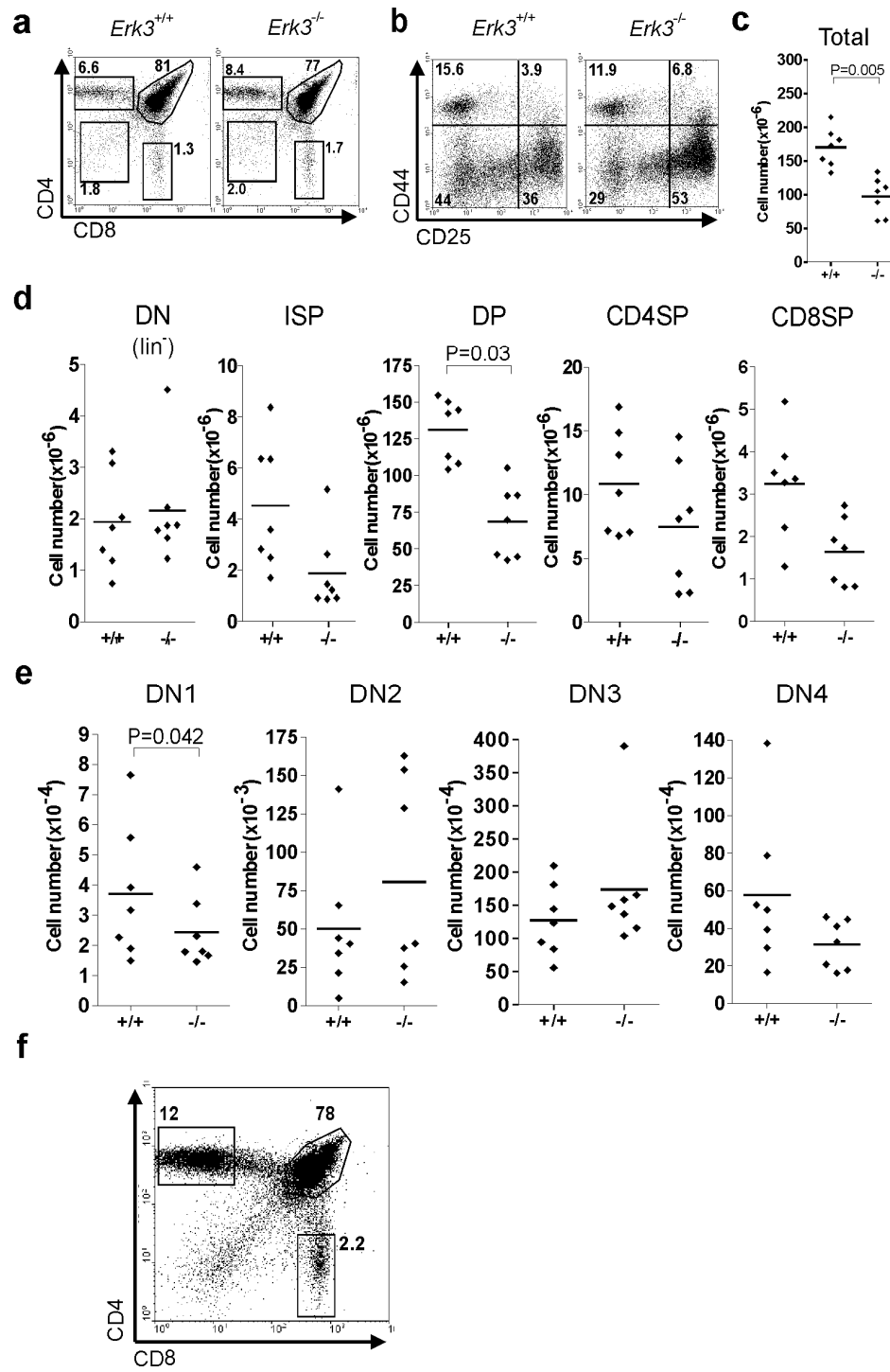


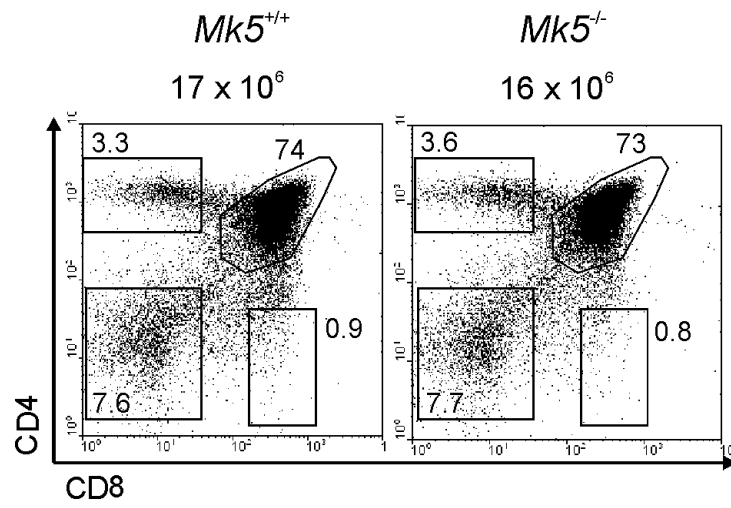
Figure 7

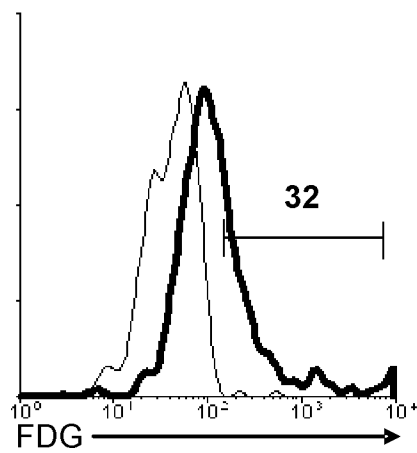
Figure S1

Figure S2

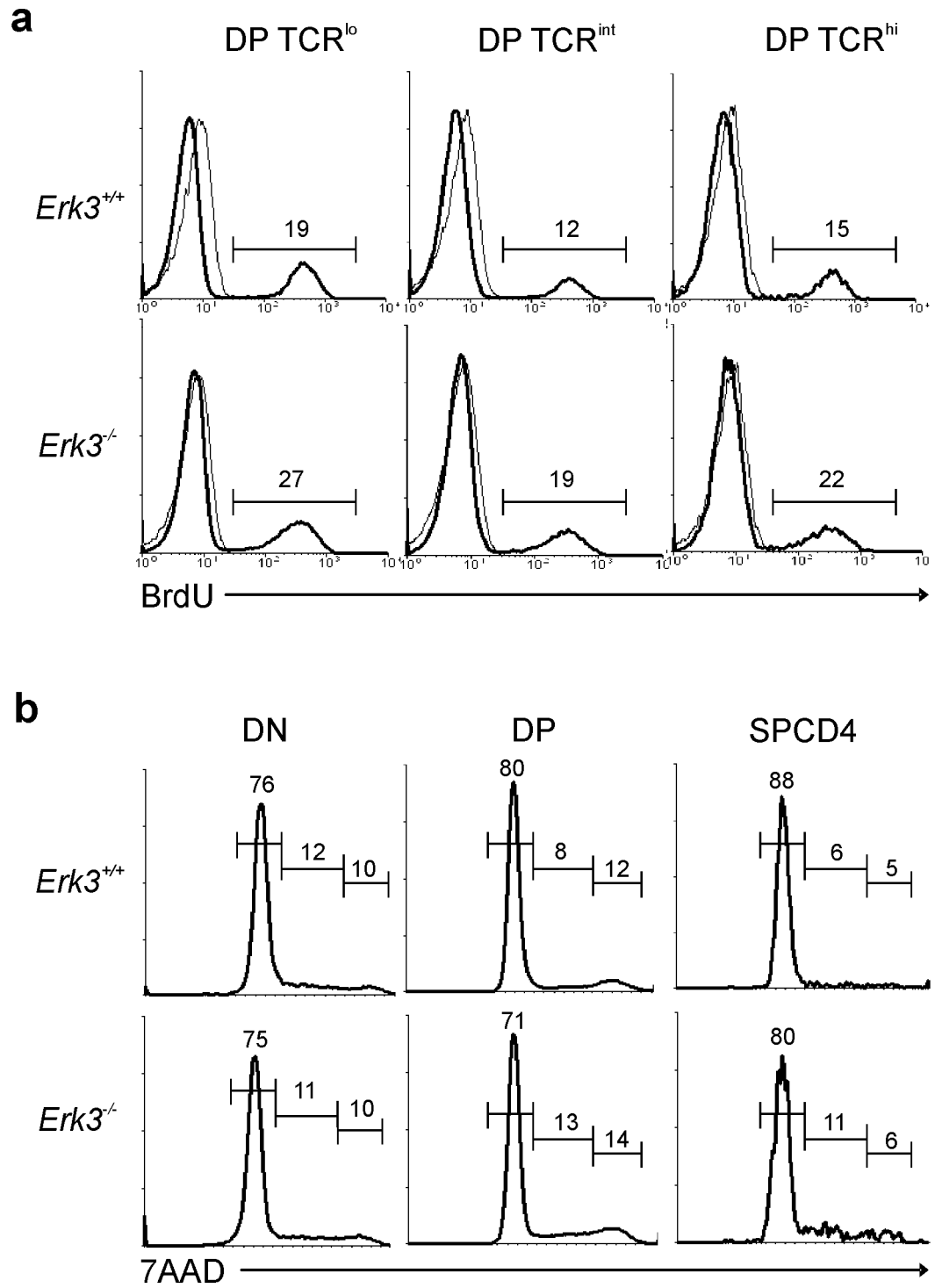


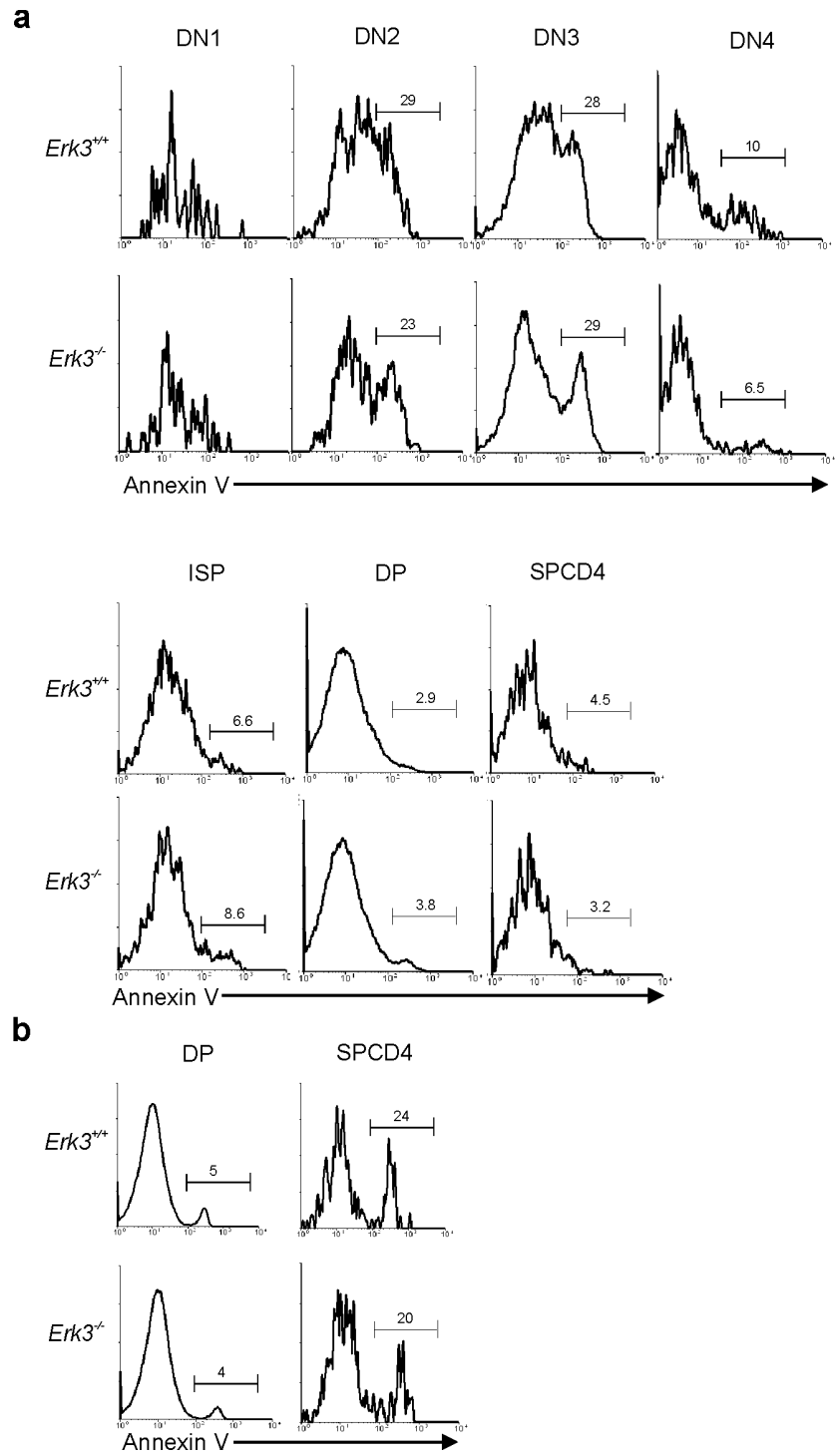
Figure S3

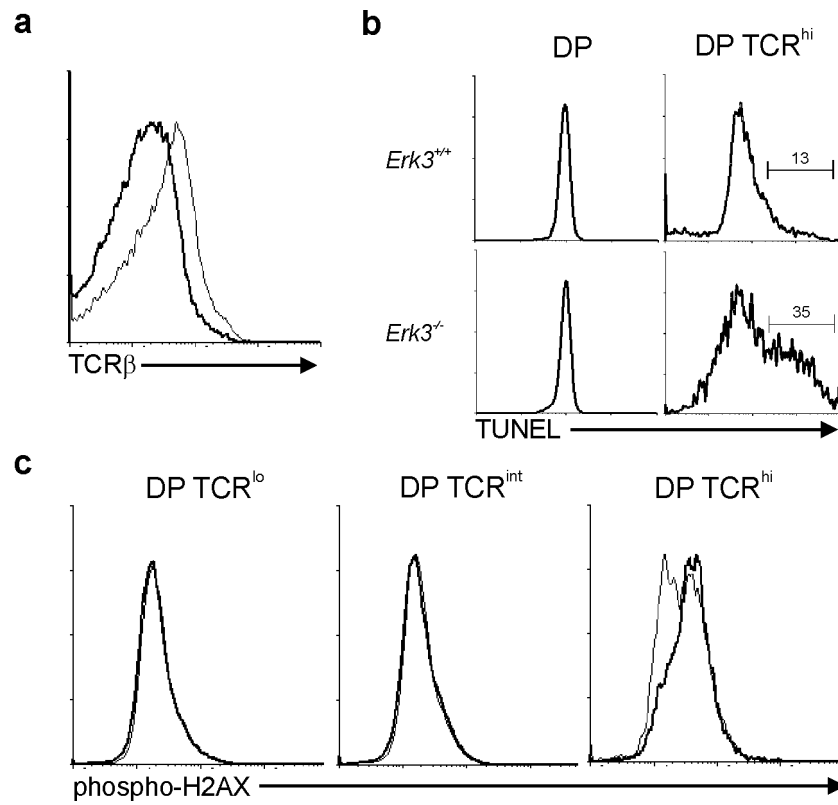
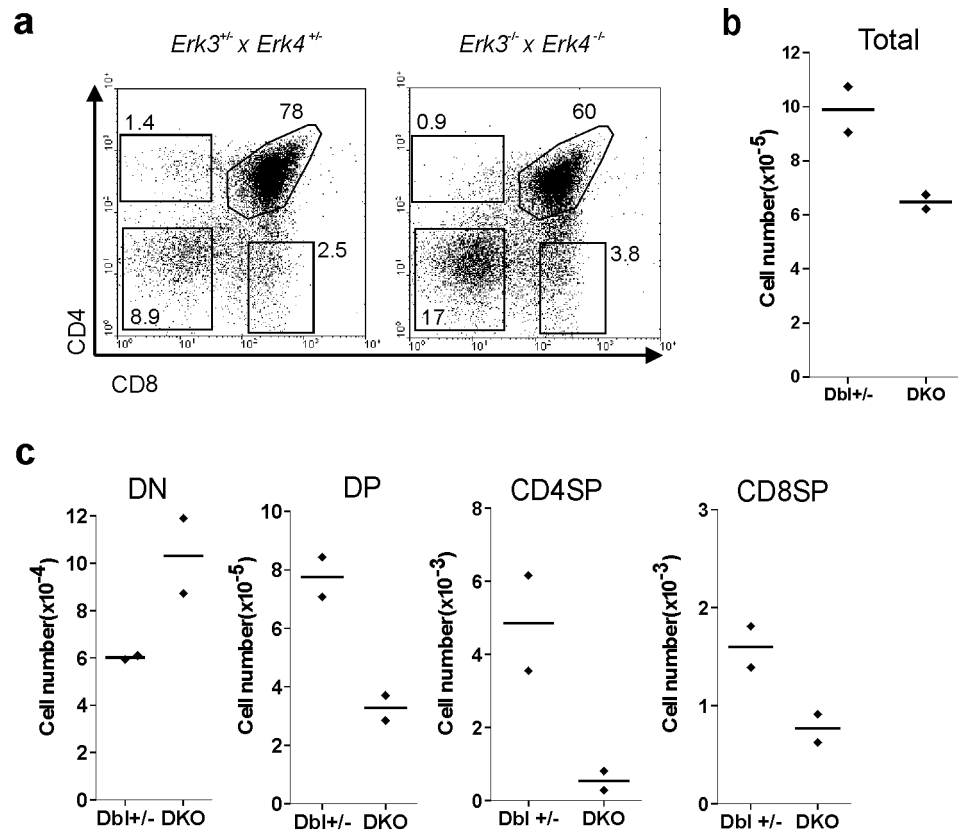
Figure S4

Figure S5



Article II. The non-classical MAP kinase ERK3 controls T cell activation

Miriam Marquis^{*†}, Justine Rousseau^{‡¶}, Julie Rooney^{*}, Benjamin Turgeon^{‡¶}, Claudine Beauchamp^{*}, Sylvain Meloche^{‡¶} and Nathalie Labrecque^{*†§1}

^{*}Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, [†]Departments of Microbiology and Immunology, [‡]Pharmacology and Molecular Biology and [§]Medicine, and [¶]Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, University of Montreal, Quebec, Canada.

Running title : ERK3 regulates T cell proliferation

² This work was supported by a Discovery grant of the Natural Sciences and Engineering Council of Canada to N.L and an Operating grant of the Canadian Institutes of Health Research to S.M.. M.M was supported by the Cole Foundation and the University of Montreal. N.L was supported by a New Investigator Award of the CIHR and currently held a Senior Scholarship of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

³Abbreviations used in this paper: LN, lymph node; FDG, Fluorescein Digalactopyranoside; KI, knock-in; SPF, specific pathogen free

Ma contribution spécifique dans cet article a été d'effectuer la plupart des expériences sauf : le western blot (Article II, Figure 1C) fait par Justine Rousseau, les expériences sur ERK4 (Article II, Figure 6) fait par Claudine Beauchamp et les répertoires RCT α et RCT β (Article II, Figure S1) fait par Julie Rooney. De plus, j'ai procédé à l'analyse de tous les résultats et participé à la conception et l'élaboration de l'article en collaboration avec ma directrice de recherche. Aussi, Benjamin Turgeon a créé la souris *Erk3*^{-/-} et Justine Rousseau, la souris *Erk4*^{-/-}. Sylvain Meloche nous a gracieusement offert les modèles animaux et a participé activement à différentes discussions reliées au projet, ainsi qu'à la révision de cet article.

Cet article sera soumis sous peu à The Journal of Immunology.

ABSTRACT

The classical MAPK ERK1 and ERK2 are activated upon stimulation of cells with a broad range of extracellular signals (including foreign Ags) allowing cellular responses to occur. ERK3 is an atypical member of the MAPK family with strong homology to ERK1/2 for which we recently described a role in T cell development. Therefore, we evaluated if ERK3 has a role in mature T cell response. Mouse resting T cells do not transcribe ERK3 but its expression is induced in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells following T cell activation. This induction of ERK3 expression in T lymphocytes was specific to TCR signaling and requires activation of the classical MAPK ERK1 and ERK2. Furthermore, ERK3-deficient T cells showed decrease T cell proliferation and cytokine secretion following *in vitro* anti-CD3 stimulation. Moreover, activated T cells lacking ERK3 are not more prone to death following TCR triggering. Further analysis revealed that T cells lacking ERK3 are unable to up-regulate the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 following TCR stimulation. These results suggest that the reduced proliferation of ERK3-deficient T cells is a consequence of their defective activation. In conclusion, the atypical MAPK ERK3 is a new and important player controlling TCR-induced T cell activation. Understanding the mechanism by which ERK3 sustains T cell activation is pivotal to design better strategies to optimize immune response in cancer patients and to ameliorate vaccination.

INTRODUCTION

The MAPK ERK1 and ERK2 are activated upon stimulation of cells with a broad range of extracellular signals (including Ags) (1, 2). Activated ERK1/2 translocate to the nucleus to phosphorylate transcription factors allowing cellular responses to occur (3). ERK3 is another member of the MAP kinase family with strong homology to ERK1/2 (4, 5) for which we recently described a role during T cell development (Marquis M et al, submitted). ERK3 is considered an atypical MAPK since it lacks the conserved Thr-Xaa-Tyr motif in the activation loop and it possess a long C-terminal extension (4, 5). The events leading to ERK3 activation and its substrates or partners are still largely unknown. Furthermore, ERK3 is constitutively phosphorylated in resting cells and its phosphorylation status does not change in response to extracellular signals (6). Moreover, ERK3 has a very short half-life in exponentially proliferating cells (7, 8) and its half-life increases during differentiation processes that are coupled to cell cycle arrest (8). Interestingly, expression of a stable form of ERK3 inhibits S phase entry (8). This suggests a role for ERK3 in cell cycle withdrawal. It is also possible that ERK3 protein accumulation is required to allow differentiation to occur.

Recently, it was shown that ERK3 interacts with the MAPK activated protein kinase 5 (MK5 or PRAK) and that this interaction results in the phosphorylation and activation of MK5 (9, 10). Moreover, this interaction leads to ERK3 stabilization and to the exclusion of both ERK3 and MK5 from the nucleus (9, 10). Although ERK3 regulates MK5 activity, ERK3 ablation only reduces MK5 activity by 50% (9). The remaining MK5 activity is due to the fact that the closest homologue of ERK3, ERK4, is also a physiological binding partner of MK5 (11, 12). Unfortunately, the identification of MK5 has a binding partner of ERK3 did not reveal any possible biological role of ERK3 since the function of MK5 is still unresolved (13, 14).

Naive T cells ($CD44^{lo}CD62L^{hi}$) circulate between lymphoid organs to patrol for the presence of invaders. The recognition of a foreign Ag presented by specialized APCs in lymphoid organs leads to T cell activation. This activation is mediated by a cascade of intracellular signaling events following the interaction of the TCR/CD3 complex and CD4/CD8 co-receptors with peptide-MHC complexes (15). Briefly, the src kinase lck (associated with CD4/CD8) phosphorylates the ITAM motifs contained in the intracellular portion of the CD3 chains. This recruits the ZAP-70 tyrosine kinase that then becomes available for phosphorylation by lck. This phosphorylation activates ZAP-70 that in turn phosphorylates different adaptor molecules (LAT, SLP-76). These adaptors then propagate the signal to three main pathways: MAPK, PLC γ 1 (calcineurin and PKC) and the PI3K pathways. The activation of these effector pathways will regulate and activate transcription factors that control gene expression leading to full activation, proliferation and differentiation of T cells. This expansion increases by up to 5000-fold the number of cells bearing an appropriate TCR. The activation and proliferation of T cells are accompanied by changes in their migration properties (able to migrate to the site of infection) and by their expression of effector functions (cytokine secretion or killing) allowing them to eliminate the infectious agent.

The classical MAPK ERK1 and ERK2 play essential roles in TCR signaling following antigen recognition. ERK1 and ERK2 activation leads to cellular response allowing T cell proliferation and differentiation (1, 2, 15). Moreover, it was recently shown that ERK2, but not ERK1, is required for optimal CD8⁺ T cell proliferation and survival (16). However, the profile of expression and the role of the non-classical MAPKs, such as ERK3 and ERK4, have not been defined yet in T cells. Therefore, since ERK3 might control differentiation and proliferation, we decided to study its role in T cell activation which requires concomitant proliferation and differentiation. Our results showed that ERK3 expression is induced in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells following T cell activation suggesting a possible role for ERK3 in T cell response. This induction of ERK3 expression in T

lymphocytes was specific to TCR signaling and required activation of the classical MAPK ERK1 and ERK2. Furthermore, ERK3-deficient T cells showed decrease T cell proliferation and cytokine secretion following *in vitro* anti-CD3 stimulation. Moreover, activated T cells lacking ERK3 are not more prone to death following TCR triggering. Further analysis revealed that T cells lacking ERK3 are unable to up-regulate the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 following TCR stimulation. These results suggest that the reduced proliferation of ERK3-deficient T cells is a consequence of their defective activation. In conclusion, the atypical MAPK ERK3 is a new and important player controlling TCR-induced T cell activation.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Erk3 heterozygote mice (Turgeon B et al, submitted) were bred under specific pathogen free (SPF) conditions at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre. *Erk4*-knock-in (*Erk4*^{ki/ki}) mice were bred at Institut de recherche en immunologie et oncologie under SPF conditions. In these mice GFP was knock-in at the ATG of the *Erk4* gene (Rousseau J et al, in preparation). B6129F1 were purchased from Taconic. All animal experimental procedures were done according to the rules of Canadian Council on Animal Care.

Hematopoietic chimeras

Fetal liver hematopoietic chimeras were generated as described (17). Briefly, fetal liver was harvested from day 13.5 embryos and culture in RPMI supplemented with 5% FBS and 5% penicillin-streptomycin at 37°C until the genotyping was done. Fetal liver were gently dissociated in media, washed 2 times and re-suspended in PBS. 2×10^6 fetal liver cells were injected i.v. into lethally irradiated (12 Gy) syngenic B6129F1 mice (5-7 wks old). Hematopoietic chimeras were analyzed 6-8 wks after grafting.

Abs and flow cytometry

The following Abs were used: anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD3 (145-2C11), anti-CD44 (IM7), anti-TCR $\gamma\delta$ (UC7-13D5), anti-CD62L (Mel-14) and anti-TCR V α 8.3 (B21.14) were purchased from Biolegend; anti-CD4 (CL012PE and CL013F), anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD69 (CL8969F), anti-CD25 (CL8925F and PC615.3) and anti-IgM were purchased from Cederlane; anti-CD8 (53-6.7), anti-FoxP3 (MF23), anti-Bcl-2 (3F11), anti-TCR V α 3.2 (RR3-16), anti-TCR V α 11.1 (RR8-1) and anti-TCR V β screening

panel were purchased from Becton Dickinson. Finally anti-TCR V α 2 (B20.1) was purchased from Invitrogen. Cell stainings were performed as described previously (18)

β -galactosidase staining

Fluorescein Digalactopyranoside (FDG; Sigma) staining was done as described by Chan et al. (19). Briefly, 4×10^6 cells were surface stained and re-suspended in 120 μ l of PBS. Cells and diluted FDG (7.5 mM) were incubated 5 min at 37°C and 80 μ l of warmed FDG was added to cells while gently vortexing. The reaction was stopped by adding 2 ml of ice-cold PBS and cells were kept on ice for 5 min. After centrifugation, cells were re-suspended in PBS 10% horse serum. Cells were then transferred to a 15°C water bath for 15-20 min to enhance β -galactosidase activity before flow cytometry analysis.

Anti-CD3 stimulation

Splenocytes (2×10^6) were stimulated in 24-well plates coated with different concentrations (0-3 μ g/ml) of anti-CD3 Ab (145-2C11; Cedarlane) in complete RPMI (supplemented with 10% FBS, penicillin-streptomycin, 2-ME, sodium pyruvate and non-essential amino acids). After 12 to 72 h, cells were harvested and stained or re-stimulated for the analysis of cytokine production. In some experiments, splenocytes were labeled with CFSE as described previously (20). In addition, some assays contained the MEK1/2 inhibitor UO129 (10 μ M).

Cytokine production

Splenocytes were activated *in vitro* with anti-CD3 Ab and harvested at 72 h. Activated splenocytes (10^6 cells/ml) were stimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in complete RPMI for 4 h at 37°C. Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 2 h of culture. Intracellular cytokine detection was performed as described previously (20).

Annexin V (AnV) staining

After in vitro stimulation, cells were cell surface stained with anti-CD4 and anti-CD8 Abs followed by AnV and 7-AAD staining in AnV binding buffer (10mM Hepes, pH7.4; 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂).

Western blot

Briefly, resting or activated splenocytes were lysed in Triton X-100 buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.4; 100 mM NaCl; 50mM NaF; 5 mM EDTA; 0.1 mM PMSF; 1 μ M leupeptin; 1 μ M pepstatin A and 1 % Triton (v/v) X-100) for 1 min at 4°C. Proteins were resolved by SDS-PAGE (7.5 % (w/v) gel) and transferred to Hybond-ECL membrane (Amersham). The membrane was blocked for 1h30 at RT in TBST (10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20 and 5 % (w/v) BSA) before incubation O/N at RT with anti-ERK3 (3G185, USBiological, MA, USA) or anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The membrane was then incubated for 1 h at RT with horseradish-peroxydase-conjugated anti-IgG. Immunoreactive bands were detected by enhances chemiluminescence (PerkinElmer LAB, inc., MA, USA).

RT-PCR

Anti-CD3 stimulated T cells RNA was extracted using Trizol (In vitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using Superscript RT and synthetic oligo(dT) (In vitrogen). PCR was performed with mouse *Erk4* primers: forward, 5'-GCGCAAGCTGCTCCCGGACGTC-3', and reverse, 5'-GCCGCCTGCTTCCAGTGCGACAG-3'. HPRT primers were described previously (21).

RESULTS

Inducible ERK3 expression in T lymphocytes

We have previously shown that ERK3 is selectively expressed by DN and DP thymocytes and that its expression was shut-off in mature CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes (Marquis M et al, submitted). Therefore, we evaluated if ERK3 expression was turned-on in peripheral T cells. To do so, we used a knock-in mouse model in which the coding sequence of *Erk3* is replaced by a β -galactosidase reporter (Turgeon, B et al, submitted). As shown in Fig. 1A, using a specific fluorescent substrate of β -galactosidase (FDG), we could not detect any β -galactosidase activity in resting CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from the spleen (SPL) and lymph nodes (LNs) showing that the *Erk3* gene is not transcribed in these cells. However, we could easily detect *Erk3* transcription in peripheral B cells (Fig. 1A). Further analysis could not detect any FDG staining in specific subsets of T cells such as naïve and activated/memory T cells (data not shown). Our previous study in thymocytes has correlated the level of expression of ERK3 with the level of TCR expression by thymocytes suggesting that TCR signals could contribute to *Erk3* transcription. Therefore, we tested if stimulation of T cells via their TCR led to induction of *Erk3* transcription. As shown in Fig. 1B, stimulation of T cells with anti-CD3 antibodies induces *Erk3* transcription in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells as detected using FDG staining. The transcription of *Erk3* was induced as early as 6 h after T cell activation, was sustained for 48 hours and almost completely extinguished after 72 h in both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 1B). Similar results were obtained using PMA and ionomycin stimulation (data not shown). Since the ERK3 protein is very unstable in proliferating cells, we confirmed by western blot that the ERK3 protein was detectable in activated T cells (Fig. 1C).

The classical MAPK ERK1 and ERK2 regulate ERK3 expression in T lymphocytes

Recently, it was shown that ERK3 expression was induced following the activation of the classical MAPK ERK1 and ERK2 in model cell lines (22). Since ERK1 and ERK2 activation occurs following TCR triggering, we evaluated if the activation of ERK1/2 was responsible for the up-regulation of *Erk3* transcription in activated T cells. To do so, we used the specific pharmacological inhibitor of ERK1/2, U0126, in our T cell activation assay. As shown in Fig. 2, the addition of U0126 to anti-CD3 stimulation completely abrogated ERK3 expression in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These results show that ERK3 expression is up-regulated via TCR-induced activation of ERK1 and ERK2 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Normal peripheral lymphoid compartment in ERK3-deficient hematopoietic chimeras

The induced expression of ERK3 following T cell activation led us to evaluate if ERK3 was necessary for the response of T cells to anti-CD3 stimulation. To do so, we generated hematopoietic chimeras using *ERK3*-deficient fetal liver cells since *Erk3*^{-/-} mice die at birth (Turgeon B et al, submitted). We have previously shown that T cell development occurs in absence of ERK3 (Marquis M et al, submitted) which makes it possible to study the function of T cells lacking ERK3. In our previous work, we have limited our analysis to thymic differentiation. Therefore, it was important to characterize the peripheral lymphoid compartment in our hematopoietic chimeras. As shown in Fig. 3, the lymphoid compartment was normally reconstituted by hematopoietic cells lacking ERK3 expression. CD4⁺, CD8⁺ and B lymphocytes were present in normal percentages (Fig. 3A) and numbers (Table I) in the spleen and LNs. Moreover, the proportion of naïve (CD44^{lo} and CD62L^{hi}) and activated/memory (CD44^{hi} and CD62L^{lo}) T lymphocytes was similar in CD4⁺ and CD8⁺ T cells lacking or not ERK3 expression (Fig. 3B). The generation of regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) and γδ T cells was normal in absence of ERK3 (Fig. 3C and D). Furthermore, *ERK3*-deficient T cells use a normal repertoire of TCR α and β chains as seen

using a panel of anti-TCR V α and V β antibodies (Supplemental Figure 1). Further analysis did not reveal any difference in the other cell types constituting secondary lymphoid organs when ERK3 is lacking (data not shown).

Defective T cell proliferation and cytokine production in absence of ERK3

The normal composition of secondary lymphoid organs in absence of ERK3 expression allowed us to study if ERK3 participates in T cell activation. *Erk3*-deficient and wild-type splenocytes were labeled with CFSE followed by *in vitro* stimulation with increasing dose of anti-CD3 Abs to evaluate T cell proliferation. As shown in Fig. 4A, ERK3-deficient CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes have a severe reduction in their proliferative capacity when they are stimulated with low and intermediate doses of anti-CD3 Abs (0.3 μ g/ml and 1 μ g/ml). Full T cell proliferation of *Erk3*^{-/-} mice was restored when high dose of anti-CD3 Abs was used (Fig. 4A). These results suggest that ERK3 contributes to T cell activation only when T cell stimulation is suboptimal. Furthermore, the lack of ERK3 expression by resting T cells suggests that ERK3-induction might contribute to sustain T cell activation. As expected for a molecule that is induced after stimulation, ERK3 deficiency does not affect the expression of early activation markers such as CD25 and CD69 by T cells (Supplemental Figure 2).

We then evaluated if the reduced T cell proliferation that we observed with ERK3 deficient T lymphocytes was leading to a reduction in cytokine production by activated T cells. To do so, CFSE-labeled splenocytes were stimulated *in vitro* with different concentrations of anti-CD3 antibodies for 72 hours. Activated T cells were then re-stimulated for 4 hours with PMA and ionomycin in the presence of Brefeldin A for the last 2 hours followed by intracellular cytokine staining. *Erk3*^{-/-} CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed a severe reduction in their ability to produce IL-2 and IFN- γ when low (0.3 μ g/ml) and intermediate (1 μ g/ml) doses of anti-CD3 were used (Fig. 4B and C). Cytokine production by ERK3-deficient T lymphocytes was normal when high dose, 3 μ g/ml, of anti-CD3

antibodies was used (Fig. 4B and C). These data suggest that ERK3 expression is necessary for optimal T cell activation.

ERK3 deficiency does not reduce the survival of activated T lymphocytes

To understand how ERK3 affects T cell proliferation and cytokine production we evaluated if activated T cells were more prone to death when ERK3 was absent. To do so, we performed a kinetic analysis of T cell apoptosis during anti-CD3 stimulation. Erk3^{-/-} and wild-type splenocytes were in vitro stimulated with anti-CD3 Abs and were collected at different times after stimulation to detect apoptosis. As shown, in Fig. 5A, ERK3-deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells did not die more by apoptosis or necrosis (not shown) than their wild-type counterpart. Further analysis revealed that T cells lacking ERK3 expressed lower level of Bcl-2 after stimulation when compared to Erk3^{+/+} T lymphocytes (Fig. 5B). This reduction of Bcl-2 expression was only seen when T cells were stimulated with low and intermediate doses of anti-CD3 Abs (Fig. 5B). These results suggest that the decrease proliferation of ERK3-deficient T cells occurs due to a reduced cellular activation which leads to reduce proliferation and differentiation of activated T cells.

ERK4 does not compensate for the absence of ERK3

The partial requirement for ERK3 in T cell activation led us to investigate if its closest homologue, ERK4 (5), was compensating for ERK3-deficiency. This was a likely possibility since it is known that these two kinases can compensate each other for the activation of MK5, the only known common substrate of ERK3 and ERK4, in mouse embryonic fibroblasts and cell lines (9-12). To address this possibility, we first evaluated if ERK4 was expressed in T lymphocytes since nothing is known about the ERK4 expression profile in the immune system. To do so, we used a knock-in mouse model in which GFP was introduced at the ATG of the Erk4 gene (Rousseau et al, manuscript in preparation). As shown in Fig. 6A, no GFP expression could be detected in T cells. Moreover, unlike ERK3, ERK4 expression was not induced by anti-CD3 stimulation (Fig. 6A). These results were

confirmed using RT-PCR (Figure 6B). All together, these results show that ERK4 cannot compensates for ERK3-deficiency in mature T cells.

DISCUSSION

Our results ascribed a new function for the atypical MAPK ERK3 in T cell activation. We have shown that resting T cells do not express ERK3 but that stimulation of T cells leads to the transcription of the *Erk3* gene. Furthermore, the induction of ERK3 expression is dependent on the activation of the classical MAPK ERK1 and ERK2. This is in agreement with another report that has shown a role for the ERK signaling pathway in the up-regulation of ERK3 expression in cell lines (22). Therefore, the regulation of ERK3 expression is similarly controlled by ERK1 and ERK2 in different cell types. The lack of expression of ERK3 by resting T cells suggests that constitutive expression of ERK3 by resting T cells could be deleterious to the cell. This might be related to the fact that ERK3 is constitutively phosphorylated in its activation loop (6) and thus probably constitutively active when expressed in cells (5, 6). Moreover, the phosphorylation and activity of ERK3 is not induced by any of the classical MAPK stimuli (5, 6). Furthermore, it is believed that ERK3 activity is regulated by its abundance. Indeed, ERK3 is a very unstable protein in highly proliferating cells and its stability increased with cell cycle arrest (8). Since naïve T cells are resting and non-proliferating, they would not be able to regulate ERK3 activity by degradation explaining why ERK3 expression is regulated in a transcriptional manner by resting naïve T lymphocytes. A different picture emerged for B cells. Our results showed that resting B cells actively transcribed the *Erk3* gene. However, we were not able to detect any ERK3 protein in the spleen which contains a high proportion of B cells (more than 60% of B cells). This suggests that ERK3 is constitutively degraded in resting B cells although these cells are not actively proliferating. Therefore, it seems that the rules governing the expression of ERK3 differs for different cell types and that ERK3 does not always accumulate in resting cells.

The up-regulation of Erk3 transcription in T cells after anti-CD3 stimulation is accompanied with a strong accumulation of the ERK3 protein. This was surprising since ERK3 was believed to be constitutively degraded during proliferation in model cell lines (8). Therefore, it suggests that activated T cells regulate differently the stability of ERK3. This might be important since ERK3 seems to play a very important role in T cell activation as shown by a decreased proliferation of T cells lacking ERK3 after TCR triggering. Therefore, ERK3 accumulation might be necessary to allow ERK3 to achieve its function in T lymphocytes.

Our results suggest a very important function for ERK3 induction in T cells to sustain their proliferation after antigenic stimulation. The fact that ERK3 is not expressed by resting T cells but rather induced after stimulation indicates that ERK3 does not participate in early TCR signaling events. This is in agreement with the fact that Erk3^{-/-} T lymphocytes efficiently up-regulate the expression of early activation markers such as CD69 and CD25. Therefore, we believe that ERK3 expression is needed to sustain T cell activation after initial TCR signaling. This is probably very important during an *in vivo* immune response since it is well established that sustained T cell activation is required for optimal T cell proliferation and differentiation (23-27). Furthermore, it is very well established that the acquisition of the ability to produce cytokine by T cells is directly related to the number of divisions made by T lymphocytes (28, 29). Thus, sustained T cell activation dependence on ERK3 is probably very important to promote the proper acquisition of effector functions by T lymphocytes during an antigenic response.

Similar results were recently observed in an ERK2-deficient mouse model (16). The conditional ablation of ERK2 in T cells leads to a dramatic decrease of anti-CD3 stimulated proliferation of CD8⁺ T cells and to a diminution of IL-2 production (16). The decreased activation of ERK2-deficient T cells was correlated with decreased expression of Bcl-2 and Bcl-X_L and increased Bim expression (16). Since ERK1/2 activation are responsible for the induction of ERK3 expression in activated T cells, it is tempting to speculate that defective

ERK3 induction will occur in absence of ERK2 which then will lead to decreased T cell proliferation and Bcl-2 expression. Therefore, we will like to suggest that ERK3 is one of the effectors of the ERK2 signaling pathway in T cells. In contrast to our results, ERK2-deficiency leads to altered CD69 and CD25 up-regulation after activation CD8⁺ T cells (16). This difference can easily be explained by the fact that ERK2 is an early downstream target of TCR signaling and therefore suggest that its activation is necessary for early activation events following TCR stimulation. ERK3-deficiency will not interfere with the expression of early T cell activation markers since its expression is not induced yet.

We have shown that ERK3-deficiency does not decrease T cell proliferation via augmentation in the apoptotic rate of activated T cells. Therefore, it suggests that ERK3 is required to sustain T cell activation and proliferation and not to promote T cell survival. This is in contrast to what we have seen during thymocyte differentiation (Marquis M et al, submitted). We have recently shown that ERK3-deficiency does not affect thymocyte proliferation but rather control their survival in response to RAG-mediated DNA double strand breaks which are generated during TCR gene recombination. Thus, ERK3 seems to be regulated differently and regulate different functions depending on the cell type used to study its function.

Our results suggest a crucial role for ERK3 when T cells are stimulated with sub-optimal or low concentration of anti-CD3 antibody. However, this is probably very significant during the in vivo response since antigen presenting cells will only display a very low number of antigenic peptide-MHC complexes at their surface (30-32). Therefore, in vivo T cell stimulation by antigen probably closely resembles in vitro activation with low dose of anti-CD3 antibody. Further studies are required to decipher the role of ERK3 during in vivo T cell response.

Very few interacting partners of ERK3 have been identified (9, 10, 33-35) and their in vivo relevance has not been studied yet (5). Interestingly, two of the molecules that were identified in yeast two-hybrid screens are molecules involved in the control of the cell

cycle, cyclin D3 and Cdc14A (33). Therefore, it is possible that defective T cell proliferation in absence of ERK3 is a direct consequence of inappropriate regulation of cyclin D3 and Cdc14A which are key regulators cell cycle progression (36-38). It is also possible that ERK3 is a key mediator of Cdc14A action since Cdc14A can dephosphorylate ERK3 in vitro (33). One of the most characterized binding partners of ERK3 is the MAPK activated kinase MK5 (9, 10). The binding of ERK3 controls the kinase activity and the cytoplasmic relocation of MK5 (6, 9, 10). However, the role of MK5 in T cell activation has not been studied yet and MK5-deficient mice.

T cell proliferation is not completely abrogated in $\text{Erk3}^{-/-}$ T cells suggesting that there might be some redundancy in function with another protein. We have also ruled out that ERK4 has a redundant function in T cell activation. This suggests that ERK3 might be the sole molecule controlling MK5 activity in T cells. Furthermore, it is also possible that some T cells can be activated in the absence of ERK3 due to stochastic variation in the level of key signaling molecules by resting T cells (39).

In conclusion, we have deciphered a novel function for ERK3 in T cell activation. ERK3 plays a very important role in sustaining T cell activation to promote proliferation and differentiation. Furthermore, our results also suggest that ERK3 is a downstream effector of the ERK2 signaling pathway in T cells. Understanding the mechanism by which ERK3 sustains T cell activation is pivotal to design better strategies to optimize immune response in cancer patients and to ameliorate vaccination.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sylvie Lesage and the members of the laboratory for helpful discussion and for careful reading of the manuscript. We thank Mélanie Lavoie and the staff of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre Animal Facility for mouse care.

REFERENCES

1. Whitehurst, C. E., T. G. Boulton, M. H. Cobb, and T. D. Geppert. 1992. Extracellular signal-regulated kinases in T cells. Anti-CD3 and 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate-induced phosphorylation and activation. *J. Immunol.* 148:3230-3237.
2. Whitehurst, C. E., and T. D. Geppert. 1996. MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J. Immunol.* 156:1020-1029.
3. Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.
4. Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche. 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem. J.* 346 Pt 1:169-175.
5. Coulombe, P., and S. Meloche. 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1773:1376-1387.
6. Deleris, P., J. Rousseau, P. Coulombe, G. Rodier, P. L. Tanguay, and S. Meloche. 2008. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J. Cell. Physiol.* 217:778-788.
7. Turgeon, B., B. F. Lang, and S. Meloche. 2002. The protein kinase ERK3 is encoded by a single functional gene: genomic analysis of the ERK3 gene family. *Genomics* 80:673-680.
8. Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche. 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 23:4542-4558.
9. Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse. 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J.* 23:4780-4791.

10. Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J.* 23:4770-4779.
11. Aberg, E., M. Perander, B. Johansen, C. Julien, S. Meloche, S. M. Keyse, and O. M. Seternes. 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J. Biol. Chem.* 281:35499-35510.
12. Kant, S., S. Schumacher, M. K. Singh, A. Kispert, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J. Biol. Chem.* 281:35511-35519.
13. Gaestel, M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:120-130.
14. Perander, M., S. M. Keyse, and O. M. Seternes. 2008. Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Front. Biosci.* 13:4617-4624.
15. Samelson, L. E. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 20:371-394.
16. D'Souza, W. N., C. F. Chang, A. M. Fischer, M. Li, and S. M. Hedrick. 2008. The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival. *J. Immunol.* 181:7617-7629.
17. Terra, R., N. Labrecque, and C. Perreault. 2002. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J. Immunol.* 169:684-692.
18. Lacombe, M. H., M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8⁺ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J. Immunol.* 175:4400-4407.
19. Chan, S., M. Correia-Neves, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 1998. Visualization of CD4/CD8 T cell commitment. *J. Exp. Med.* 188:2321-2333.
20. Allard, E. L., M. P. Hardy, J. Leignadier, M. Marquis, J. Rooney, D. Lehoux, and N. Labrecque. 2007. Overexpression of IL-21 promotes massive CD8⁺ memory T cell accumulation. *Eur. J. Immunol.* 37:3069-3077.
21. Ostiguy, V., E. L. Allard, M. Marquis, J. Leignadier, and N. Labrecque. 2007. IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J. Leukoc. Biol.* 82:645-656.

22. Hoeflich, K. P., M. T. Eby, W. F. Forrest, D. C. Gray, J. Y. Tien, H. M. Stern, L. J. Murray, D. P. Davis, Z. Modrusan, and S. Seshagiri. 2006. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *Int. J. Oncol.* 29:839-849.
23. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat. Immunol.* 4:355-360.
24. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
25. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 12:92-98.
26. Obst, R., H. M. van Santen, D. Mathis, and C. Benoist. 2005. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J. Exp. Med.* 201:1555-1565.
27. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M. J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* 203:2135-2143.
28. Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, and S. L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229-237.
29. Richter, A., M. Lohning, and A. Radbruch. 1999. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.* 190:1439-1450.
30. Demotz, S., H. M. Grey, and A. Sette. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249:1028-1030.
31. Harding, C. V., and E. R. Unanue. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346:574-576.
32. Valitutti, S., and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol. Today* 18:299-304.
33. Hansen, C. A., J. Bartek, and S. Jensen. 2008. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* 7:325-334.

34. Sun, M., Y. Wei, L. Yao, J. Xie, X. Chen, H. Wang, J. Jiang, and J. Gu. 2006. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:209-214.
35. Anhe, G. F., A. S. Torrao, T. C. Nogueira, L. C. Caperuto, M. E. Amaral, M. C. Medina, A. K. Azevedo-Martins, A. R. Carpinelli, C. R. Carvalho, R. Curi, A. C. Boschero, and S. Bordin. 2006. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 251:33-41.
36. Kaiser, B. K., Z. A. Zimmerman, H. Charbonneau, and P. K. Jackson. 2002. Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Mol. Biol. Cell.* 13:2289-2300.
37. Mailand, N., C. Lukas, B. K. Kaiser, P. K. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas. 2002. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat. Cell. Biol.* 4:317-322.
38. Bartkova, J., J. Lukas, M. Strauss, and J. Bartek. 1998. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17:1027-1037.
39. Feinerman, O., J. Veiga, J. R. Dorfman, R. N. Germain, and G. Altan-Bonnet. 2008. Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science* 321:1081-1084.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Inducible ERK3 expression in T lymphocytes. *A*, Resting T lymphocytes do not express ERK3. Splenocytes and LN cells from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{+/-} mice were cell surface stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-B220 Abs followed by intracellular detection of β -galactosidase activity using FDG. FDG staining is shown for CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells. *Erk3*^{+/+} cells were used as a negative control for FDG staining. *B*, Induction of ERK3 expression by T cells following anti-CD3 stimulation. Splenocytes from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{+/-} mice were *in vitro* stimulated with coated anti-CD3 Abs for 6, 24, 48 and 72 h. Cells were cell surface stained with anti-CD4 and anti-CD8 Abs followed by FDG staining to measure β -galactosidase activity. The overlays show β -galactosidase activity (FDG) in CD4⁺ (top) and CD8⁺ (bottom) T cells at different times after activation. *Erk3*^{+/+} splenocytes were used as negative control for FDG staining. *C*, ERK3 protein is detectable 48h after T cell activation. Western blot analysis of ERK3 protein in lysates of unstimulated (NS), anti-CD3 stimulated (α -CD3) and PMA-ionomycin (P+I) stimulated wild-type splenocytes. Anti-GAPDH Ab was used as loading control.

FIGURE 2. *Erk3* transcription is controlled by the classical MAPK ERK1 and ERK2. Splenocytes from *Erk3*^{+/-} mice were stimulated with coated anti-CD3 Abs (1 μ g/ml) for 24h or 48h in the presence or absence of the pharmacologic inhibitor of ERK1/2, U0126. Cells were cell surface stained with anti-CD4 and anti-CD8 Abs followed by FDG staining to measure β -galactosidase activity. The overlays show β -galactosidase activity (FDG) in CD4⁺ (top) and CD8⁺ (bottom) T cells after 24h (left) or 48h (right) of stimulation. β -galactosidase activity by unstimulated (NS) T cells is shown as negative control.

FIGURE 3. Normal peripheral compartment in ERK3-deficient hematopoietic chimeras. *A*, Lymphocyte subsets distribution in the LN and spleen of hematopoietic chimeras deficient or not for ERK3. CD4/CD8 and B220/IgM profiles are shown for mice reconstituted with *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} fetal liver cells. *B*, Phenotype of ERK3-deficient T lymphocytes in the LN

and spleen. CD44/CD62L profiles are shown for CD4⁺ and CD8⁺ T cells recovered from the LN and spleen of hematopoietic chimeras deficient or not for ERK3. *C*, CD4⁺ regulatory T cells are produced normally in the absence of ERK3. CD25/FoxP3 profiles gated on CD4⁺ T cells are shown from the spleen of mice reconstituted with *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} fetal liver cells. *D*, Normal distribution of $\gamma\delta$ T cells in the spleen of hematopoietic chimeras deficient or not for ERK3. The histograms show TCR $\gamma\delta$ expression gated on CD4⁻CD8⁻CD3⁺ splenocytes. The percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells is indicated on the histogram.

FIGURE 4. Defective T cell proliferation and cytokine production by ERK3-deficient T cells. *A*, Defective proliferation of *Erk3*^{-/-} T lymphocytes after anti-CD3 stimulation. Splenocytes from *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras were labeled with CFSE and stimulated with different doses of anti-CD3 Ab for 72 h. CFSE profiles gated on CD4⁺ or CD8⁺ T cells lacking or not ERK3 are shown for the different anti-CD3 Ab concentrations. *B* and *C*, Reduced production of IL-2 (*B*) and IFN- γ (*C*) by ERK3-deficient T cells after anti-CD3 stimulation. After 72 h of anti-CD3 stimulation, activated T cells were stimulated with PMA and ionomycin for 4 h. Brefeldin A was added for the last 2 h of culture. IL-2 and IFN- γ production was detected using intracellular cytokine staining. CFSE/IL-2 and CFSE/IFN- γ profiles gated on CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes deficient or not for ERK3 are shown for the different anti-CD3 Ab concentrations. Numbers in parenthesis represent the % of proliferating and cytokine producing cells.

FIGURE 5. Normal survival of activated T lymphocytes in absence of ERK3 despite reduced level of Bcl-2 expression. *A*, No increase death of ERK3-deficient T cells after anti-CD3 stimulation. Splenocytes from *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} hematopoietic chimeras were stimulated or not with anti-CD3 Ab (0.3 μ g/ml). Cells were harvested at different times after activation (24, 48 and 72 h) and stained with AnnexinV (AnV) to measure cell death. AnV profiles gated on CD4⁺ or CD8⁺ T cells lacking or not ERK3 are shown for different time of anti-CD3 stimulation. *B*, Defective increase in Bcl-2 expression by ERK3-deficient

activated T lymphocytes. Splenocytes from mice reconstituted with *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} fetal liver cells were stimulated with different doses of anti-CD3 Ab (0-1 µg/ml) for 48 h. Cells were harvested and stained intracellularly to detect Bcl-2 expression. The histograms show Bcl-2 expression gated on CD4⁺ or CD8⁺ T cells deficient or not for ERK3 stimulated with different doses of anti-CD3 Ab. Isotype control (Iso) for each sample is shown

FIGURE 6. ERK4 does not compensate for ERK3 in T cells. *A*, ERK4 is not expressed by resting and activated T lymphocytes. Splenocytes from wild-type mice or mice with a knock-in GFP at the ATG of the *Erk4* gene (*Erk4*^{ki/ki}) were used. The knock-in GFP was used to detect ERK4 expression by T cells. Splenocytes from wild-type mice or mice with a knock-in GFP at the ATG of the *Erk4* gene (*Erk4*^{ki/ki}) were stimulated with anti-CD3 Ab (1 µg/ml) for 24 to 48 h. Cells were harvested and stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Histograms show GFP expression by CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes from *Erk4*^{+/+} or *Erk4*^{ki/ki} mice stimulated with anti-CD3 Ab for 24, 48 or 72 h. NS, unstimulated ex vivo T cells. *B*, *Erk4* transcription is undetectable by RT-PCR in activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Wild-type CD4⁺ and CD8⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 Ab (1 µg/ml) for 6 to 96 h. Cells were harvested to perform RT-PCR. ERK4 specific oligonucleotides were used to amplify ERK4 by PCR. HPRT was used as an internal control. RNA extracted from the brain was used as a positive control (ctrl) for ERK4 amplification. NS, unstimulated splenocytes.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Polyclonal repertoire of TCR usage by T cells lacking ERK3. CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the spleen of *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} fetal liver chimeras were stained with a panel of anti-TCR Vβ (A) and anti-TCR Vα (B) antibodies. The percentage of Vα⁺ and Vβ⁺ cells within the CD4⁺ and CD8⁺ fractions is shown for *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} T cells.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Normal expression of the early activation markers CD69 and CD25 by ERK3-deficient T cells after anti-CD3 stimulation. Splenocytes from mice reconstituted with *Erk3*^{+/+} or *Erk3*^{-/-} fetal liver cells were stimulated with different doses of anti-CD3 antibody (0,3 and 1 µg/ml) or with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) (P+I) for 24 h. Cells were harvested and stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 and anti-CD69 antibodies

FIGURE 1

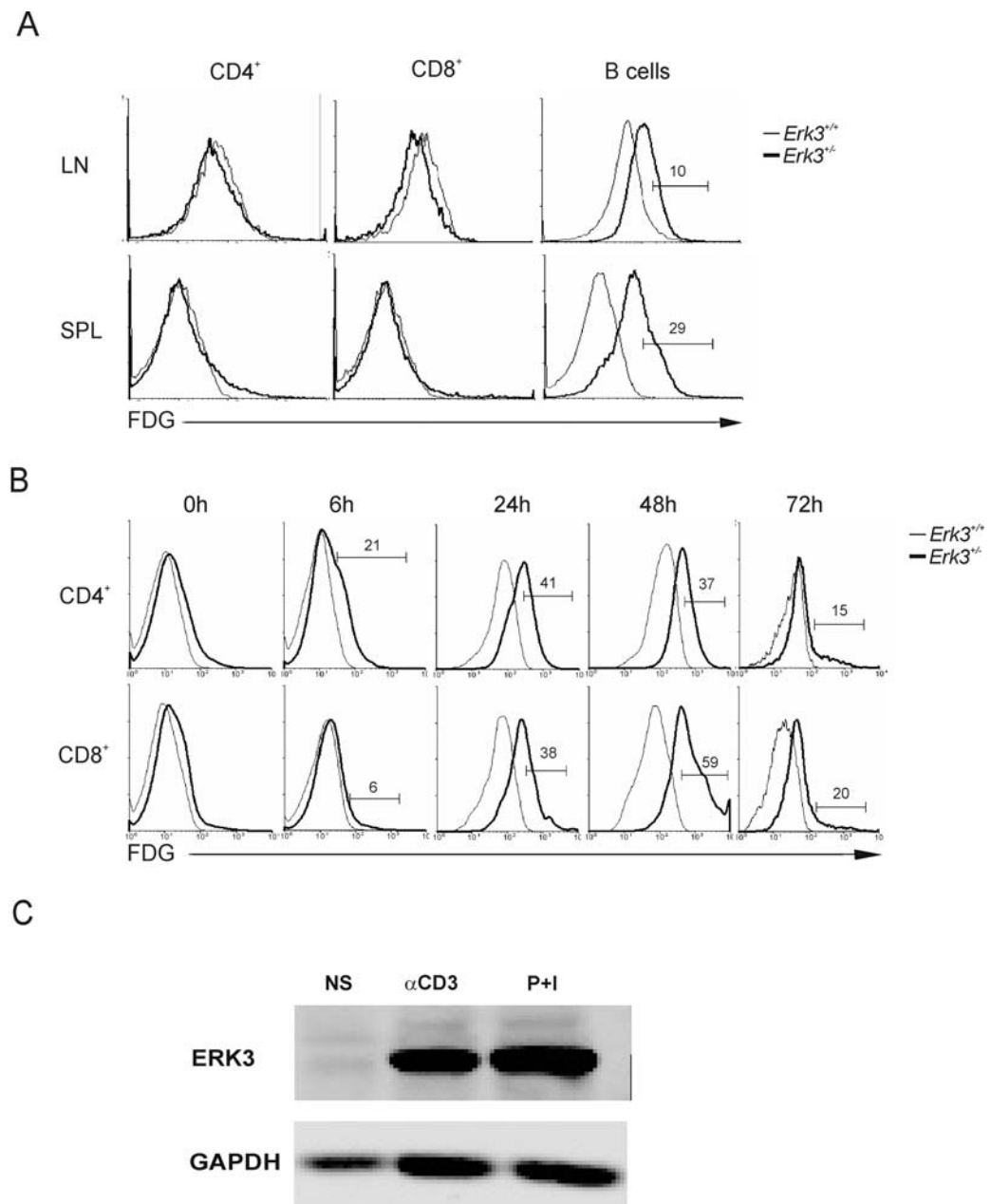


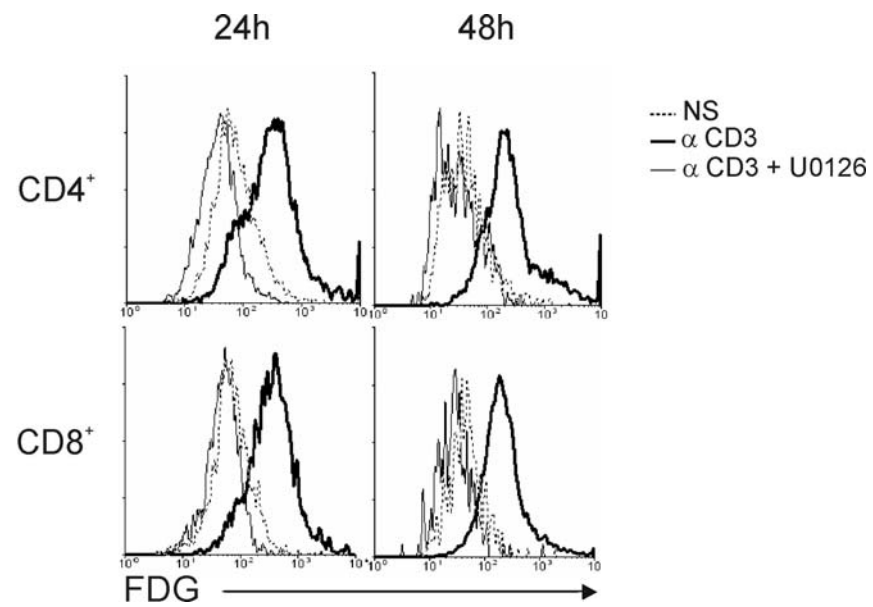
FIGURE 2

FIGURE 3

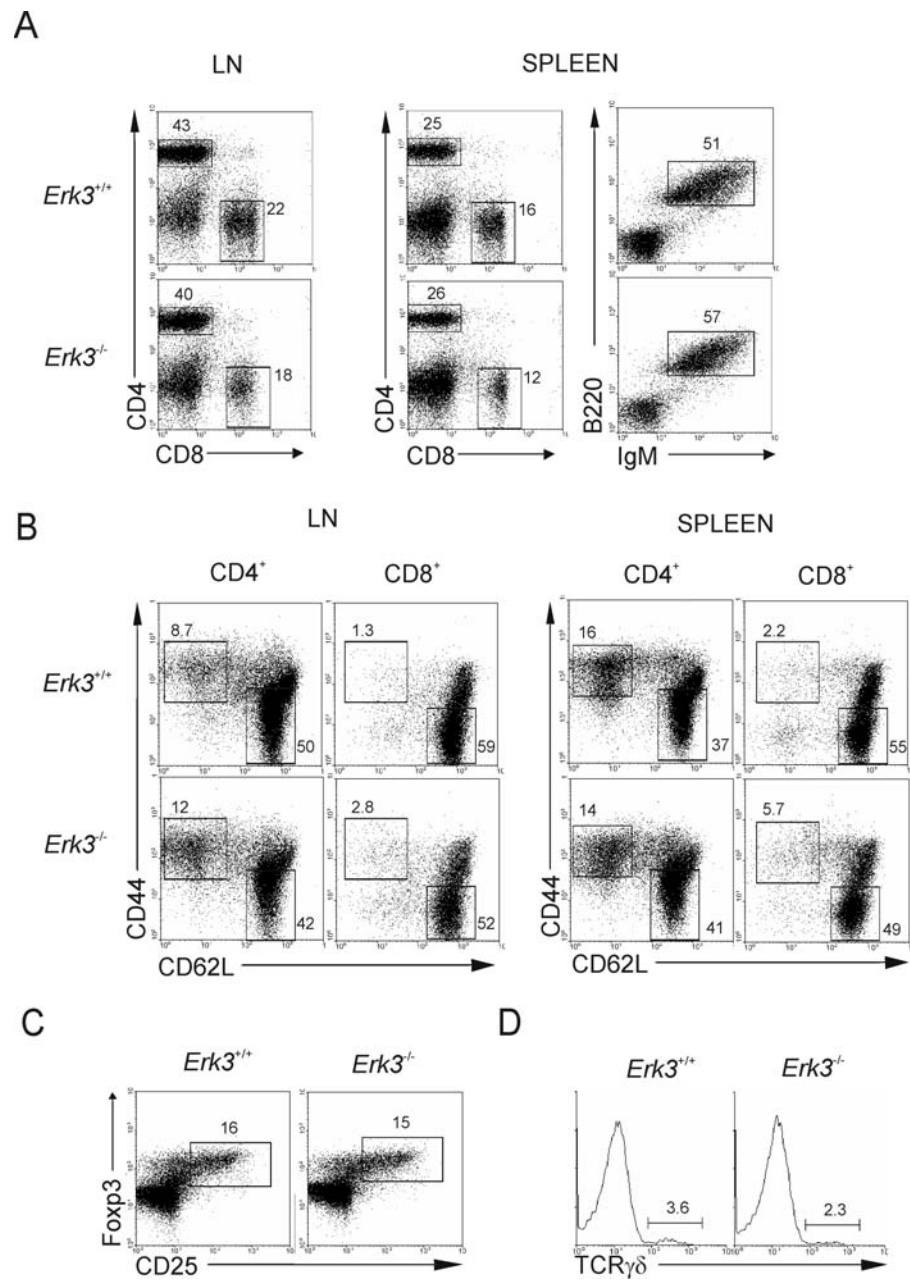


FIGURE 4

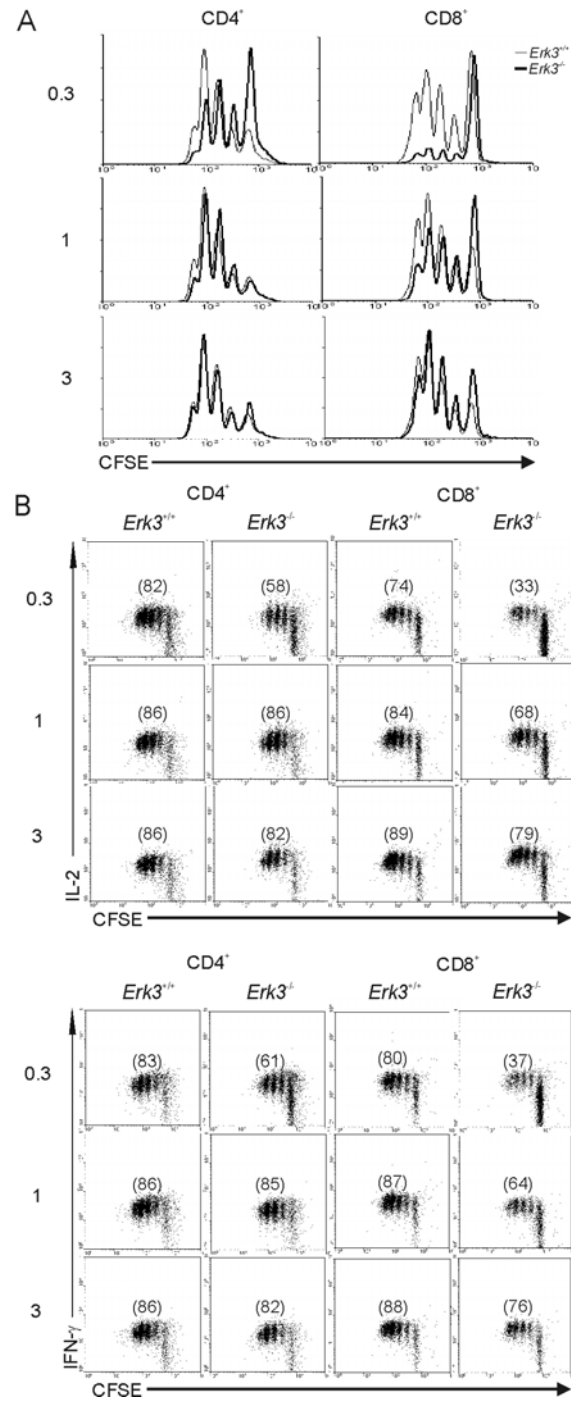


FIGURE 5

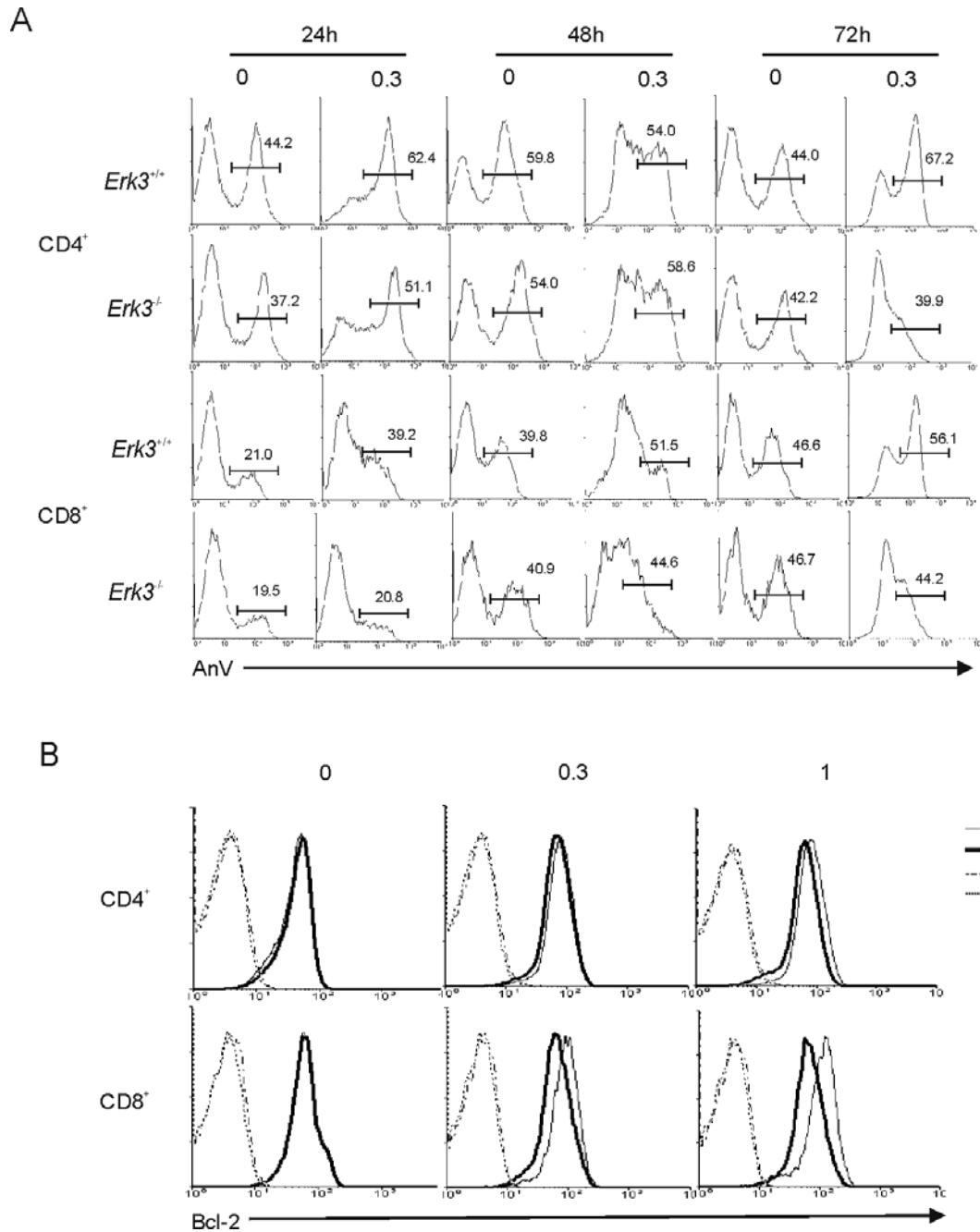
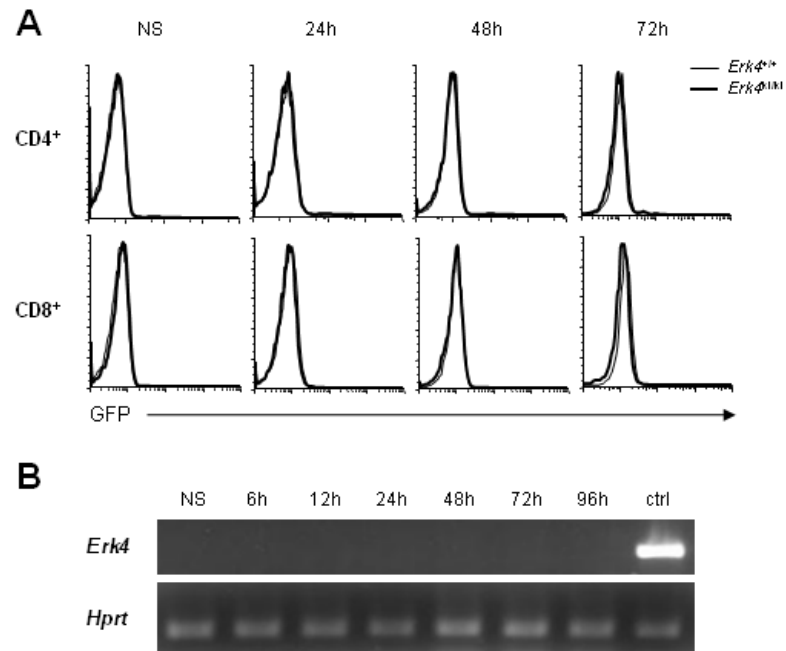
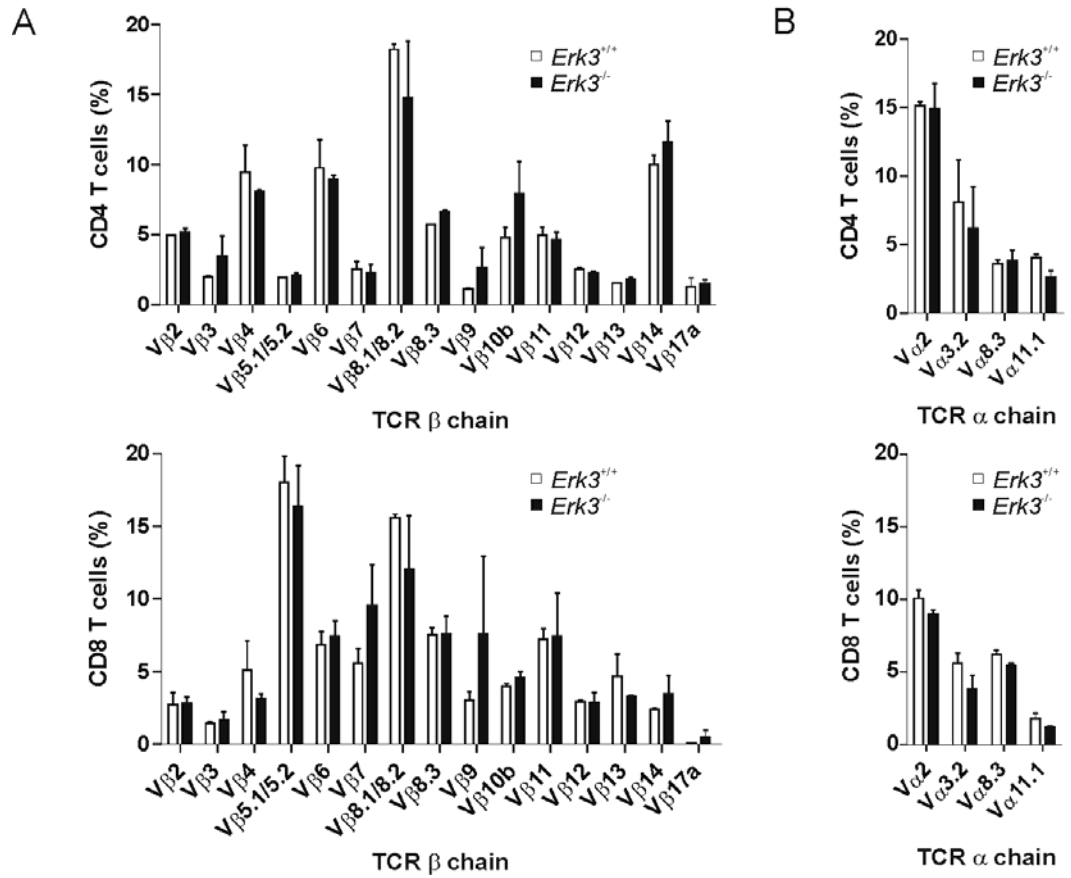


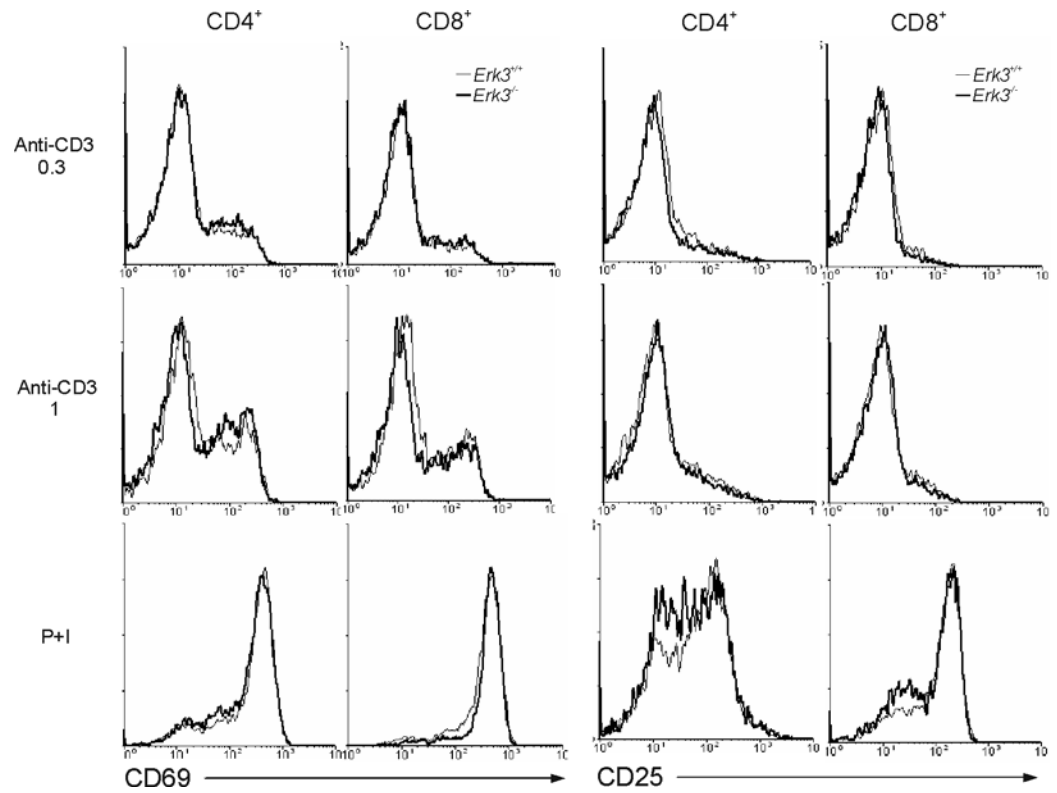
FIGURE 6



SUPPLEMENTAL FIGURE 1



SUPPLEMENTAL FIGURE 2



Discussion

L'objectif général de cette thèse consistait à évaluer si ERK3 contribue, comme les MAPK conventionnelles (ERK1/2, p38 α , JNK1/2 et ERK5), au développement intrathymique ainsi qu'à la biologie des LT. Tel que discuté dans l'introduction, ERK3 fait partie du groupe des MAPK non-conventionnelles et parmi ces dernières, seule NLK a été évaluée dans le développement et l'activation des LT sans qu'aucun rôle dans ces phénomènes ne lui soit attribuée. De plus, jusqu'à tout récemment, aucune fonction physiologique n'avait été identifiée pour ERK3 et les quelques informations disponibles, issues d'expériences *in vitro*, ont permis de suggérer que ERK3 pourrait contribuer à la régulation de la différenciation cellulaire. À partir de ces différentes informations, nous nous sommes posé les questions suivantes :

- Est-ce que l'abolition de ERK3 entraînera une détérioration des étapes de prolifération et/ou de différenciation cellulaire qui caractérisent le développement des LT?
- Sachant que les LT naïfs prolifèrent et se différencient en cellules effectrices (T_H1/T_H2/T_H17 ou T CD8⁺ cytotoxiques) suite à la reconnaissance antigénique, est-ce que l'absence de ERK3 altérera leur activation et/ou différenciation?

ERK3 et le développement intrathymique des LT

Introduction

Dans l'article I, nous avons étudié le développement intrathymique des LT chez un modèle de souris ERK3-déficient. Au départ, nous avons observé que l'abolition de ERK3 chez les nouveau-nés entraîne une diminution significative du nombre de DN1, de DP et un blocage de la différenciation vers la lignée des SP CD4⁺ (Article I, Figure 2). Ensuite, nous avons déterminé que les phénotypes observés aux étapes DN1 et DP sont autonomes aux

thymocytes, alors que le blocage en SP CD4⁺ est dépendant de l'abolition concomitante de ERK3 dans les TEC et dans les thymocytes (Article I, Figure 6). Nous avons étudié plus en détail l'étape DP chez la souris *Erk3*^{-/-} et nous avons premièrement observé que le nombre de DP *Erk3*^{-/-} RCT^{faible} est normal alors que le nombre de DP *Erk3*^{-/-} RCT^{int} et DP *Erk3*^{-/-} RCT^{fort} est fortement diminué comparativement aux mêmes groupes de cellules *Erk3*^{+/+} (Article I, Figure 5). En lien direct avec cette observation, nous avons montré que les DP *Erk3*^{-/-} RCT^{fort} meurent davantage que les DP *Erk3*^{+/+} RCT^{fort} et qu'en plus que les DP *Erk3*^{-/-} expriment 2x plus d'ARNm de la molécule pro-apoptotique Noxa que les DP *Erk3*^{+/+} (Article I, Figure 4). Malgré tout, ERK3 ne semble pas requise pour la survie des DP *per se* puisque nous avons montré que l'expression de *Bcl-xl* est équivalente chez les DP *Erk3*^{-/-} et les DP *Erk3*^{+/+} (Article I, Figure 4). Finalement, nous avons démontré que les DP *Erk3*^{-/-} accumulent des DSB dans leur ADN et que ce phénotype est dépendant de la présence des enzymes RAG (Article I, Figure 5). Puisque l'accumulation de DSB est hautement génotoxique pour la cellule, ceci explique l'augmentation d'apoptose que nous avons observé chez les DP *Erk3*^{-/-}. Ces résultats permettent, pour la toute première fois, d'identifier un rôle pour ERK3 dans le développement thymique. Bien entendu, la fonction précise de ERK3 à l'étape DP est encore indéterminée, mais il est tout de même possible à partir de certains résultats que nous avons obtenus, ainsi que d'informations disponibles dans la littérature, d'émettre certaines hypothèses telles que (Figure 17): 1) ERK3 pourrait contrôler directement l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'expression des enzymes RAG; 2) ERK3 pourrait faire parti du système de réparation des DSB ; et 3) ERK3 pourrait participer au système de surveillance et de détection des dommages faits à l'ADN. De plus, certaines questions résultent de cette étude telles que : i) Quelle est la fonction de ERK3 au stade DN1? ii) Pourquoi le blocage en SP CD4⁺ requiert l'abolition simultanée de ERK3 dans les TEC et dans les thymocytes? Et iii) Quel est l'identité des partenaires de ERK3? Dans la section suivante de cette thèse, chacune de ces hypothèses et questions sera présentée et argumentée.

Hypothèses, questions et discussion

Hypothèse 1: ERK3 contrôle l'arrêt du cycle cellulaire ou l'expression des RAG à l'étape DP

Si ERK3 contrôlait l'arrêt du cycle cellulaire à l'étape DP, son absence entraînerait une augmentation de la prolifération et par conséquent une altération de l'expression de la protéine RAG-2 puisque cette dernière est instable dans les cellules en prolifération. Ainsi, une diminution de l'expression de RAG-2 causerait une réduction de la proportion des DSB faits dans l'ADN et finalement une diminution de l'expression du RCT à la surface des DP. Nous avons observé chez les DP *Erk3*^{-/-} une augmentation de la proportion de cellules en phase S ainsi qu'une diminution de l'expression du RCT (Article I, Figure 4B et C; Figure 5A). Par contre, nous avons aussi montré chez les mêmes cellules une augmentation marquée de la phosphorylation de l'histone H2AX qui corrèle directement avec la quantité de DSB présents dans l'ADN (Article I, Figure 5D et E). De plus, nous avons démontré que ces DSB sont dépendants de l'activité des RAG (Article I, Figure 5F et G). À partir de ces résultats, deux différentes hypothèses sont envisageables. Premièrement, ERK3 pourrait malgré tout être un régulateur de l'arrêt du cycle cellulaire en DP et deuxièmement, ERK3 pourrait participer à la régulation de l'expression des RAG à cette même étape.

Effectivement, la première hypothèse est plausible puisque chez les souris *Erk3*^{-/-}, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules en phase S, ce qui pourrait corrélérer avec une augmentation de la prolifération cellulaire à cette étape. Toutefois, nous avons montré que le nombre total de DP *Erk3*^{-/-} BrdU⁺ n'est pas augmenté comparativement à celui des DP *Erk3*^{+/+} BrdU⁺ (Article I, Figure 4C). Malgré tout, ce résultat n'exclue pas la possibilité que les DP *Erk3*^{-/-} peuvent proliférer davantage et par conséquent survivent moins bien que les DP *Erk3*^{+/+} à cette prolifération anormale. Nous avons montré que les DP RCT^{fort} meurent plus chez la souris ERK3-déficiente (Article I, Figure 4D et E). Par contre, nous n'avons pas observé une augmentation de l'apoptose chez

les DP *Erk3*^{-/-} RCT^{faible} ou RCT^{int}. Il est possible que nous n'ayons pas réussi à observer l'apoptose de ces cellules à cause de l'efficacité des cellules phagocytaires présentes dans le cortex du thymus. Malgré tout, l'observation que les DP *Erk3*^{-/-} expriment davantage d'ARNm de *Noxa* indique que ces cellules doivent probablement être plus sensibles à l'apoptose que les DP *Erk3*^{+/+} (Article I, Figure 4D).

La transition G₀/G₁ du cycle cellulaire est contrôlée par les kinases cyclines-dépendantes 4 et 6 (Cdk4-6) et ces dernières sont actives uniquement sous forme d'un complexe avec des cyclines de type D1 à 3. Une fois activé, le complexe Cdk/cycline va engager la cellule irréversiblement dans le cycle cellulaire ainsi que dans l'entrée en division cellulaire. Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'activité transitoire des Cdk, tels que l'assemblage temporaire des complexes Cdk/cyclines, des modifications post-traductionnelles qui conduisent à l'activation ou à l'inactivation des Cdk, ainsi que des associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques de la famille Ink4 et de la famille Cip/Kip [526]. Dans le cas présent, ERK3 pourrait être impliquée dans l'activation de facteurs de transcription nécessaires à l'expression d'un de ces inhibiteurs protéiques ou encore dans l'activation d'une phosphatase impliquée dans l'activation d'un de ces inhibiteurs des Cdk. Il est très intéressant de discuter ici plus en détail de cette dernière possibilité. En effet, il a été démontré que ERK3 et la phosphatase Cdc14A forment un complexe *in vitro* et *in vivo* [95]. Cette dernière fait partie de la famille des phosphatases Cdc14 qui inclue chez l'humain les phosphatases Cdc14A et Cdc14B [527]. Il a été montré que Cdc14 déphosphoryle et active les inhibiteurs de Cdk et par conséquent, ceci entraîne l'arrêt du cycle cellulaire [527, 528]. De plus, il a été montré que la phosphatase CDC-14 (orthologue de Cdc14 chez *C. elegans*) est requise pour assurer l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ pendant les longues périodes de quiescence nécessaires au développement embryonnaire [529]. En effet, l'équipe de Saito a montré que la mutation de CDC-14 chez *C. elegans* entraîne l'apparition de divisions additionnelles pendant le développement, ce qui indique que la déphosphorylation des inhibiteurs de Cdk est un élément important pour le contrôle de la prolifération cellulaire au cours du développement [529]. De plus et tel que mentionné

dans l'introduction, il a été montré que la surexpression de Cdc14 chez la levure cause le même phénotype qu'une surexpression de ERK3 dans des lignées cellulaires, c'est-à-dire un arrêt du cycle cellulaire en G₁ [79, 85, 96, 98]. Bien qu'il n'existe actuellement aucune information sur la fonction physiologique de Cdc14 chez le mammifère et encore moins dans le développement thymique, ces différentes informations appuient favorablement l'hypothèse que ERK3 pourrait être importante pour la régulation de l'entrée en G₁ du cycle cellulaire chez les DP et ce, en interagissant avec Cdc14A (Figure 17).

Toutefois, cette hypothèse n'explique pas l'augmentation de DSB observés chez les DP *Erk3*^{-/-}, ni la diminution d'expression du RCT. Il est tout à fait possible qu'en absence de ERK3, ce soit les cellules DP qui ne prolifèrent pas qui meurent préférentiellement et ceci expliquerait pourquoi nous observons le même nombre de cellules BrdU⁺ entre les DP *Erk3*^{-/-} et les DP *Erk3*^{+/+} bien que le nombre total de DP ERK3-déficient soit significativement diminué. Puisque les DSB sont créés par les enzymes RAG à l'étape DP, est-ce que ERK3 pourrait participer à la régulation transcriptionnelle ou encore post-traductionnelle des RAG chez les DP? Il est intéressant de mentionner ici que ERK3 et les RAG sont présentes seulement chez les vertébrés, ce qui indique qu'elles doivent sûrement être impliquées dans des phénomènes uniques à ces derniers, comme par exemple la recombinaison V(D)J. Aussi, nous avons observé une diminution du nombre de LB dans la moelle osseuse des chimères *Erk3*^{-/-}, ce qui pourrait renforcer l'idée que ERK3 participe à la régulation des enzymes RAG (résultats non-montrés). Nous avons évalué la transcription des enzymes RAG par PCR quantitatif en temps réel et nous n'avons observé aucune différence entre les DP *Erk3*^{-/-} et les DP *Erk3*^{+/+} (résultats non-montrés). Par conséquent, ERK3 n'intervient pas dans la régulation transcriptionnelle des RAG à l'étape DP. Il est maintenant bien connu que seule l'expression de la protéine RAG-2 varie selon les étapes du cycle cellulaire et que cette dernière s'accumule pendant la phase G₁ [530]. Quel pourrait être le mécanisme moléculaire qui pourrait expliquer que l'absence de ERK3 entraîne une augmentation de l'expression de RAG-2 au stade DP? Actuellement, tout ce qui est connu sur la régulation protéique de RAG-2 à l'étape DP est que cette dernière

possède un signal de dégradation qui est activé par une ou plusieurs Cdk activées lors de la sélection positive [531]. Il est donc peu probable que ERK3 participe à la dégradation de RAG-2, puisque nous avons observé que la sélection positive semble normale chez la souris *Erk3*^{-/-} (expression équivalente de CD69 et de CD5 chez les thymocytes *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+}, résultats non-montrés). De plus, l'accumulation des DSB est limitée à l'étape DP chez les souris *Erk3*^{-/-}, ce qui indique que l'expression des RAG a été arrêtée normalement. À partir de ces différentes informations, il est peu concevable que ERK3 participe à la régulation de l'activité de RAG-2. De plus, le développement des LB ne fut pas investigué plus en détail dans ce projet, donc il est possible que la diminution du nombre de LB en absence de ERK3 soit causée par n'importe quel autre rôle suggéré pour ERK3 dans la présente discussion. Afin d'enrayer définitivement cette possibilité, l'expression protéique de RAG-2 devrait être évaluée chez les DP *Erk3*^{-/-} (Figure 17).

Hypothèse 2: ERK3 participe directement à la réparation de l'ADN.

À partir de certains de nos résultats, nous pouvons affirmer que ERK3 ne participe probablement pas au système de réparation de l'ADN lors du réarrangement V(D)J. Effectivement, si ERK3 faisait parti du NHEJ, nous aurions probablement observé chez la souris *Erk3*^{-/-} le même blocage à l'étape DN3 qui est caractéristique de l'abolition individuelle, chez la souris, de chacune des molécules qui compose ce dernier [532-539]. Par contre, il n'est pas impossible que ERK3 régule certaines molécules qui font parti du NHEJ au stade DP. Afin de vérifier cette possibilité, l'expression protéique de chacune des molécules du NHEJ (DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4, Artémis et la ligase IV) devrait être évaluée chez les DP *Erk3*^{-/-}. Malgré tout, il est aussi possible que les protéines du NHEJ soient exprimées normalement, mais que ce soit leur recrutement aux DSB ou la phosphorylation de certaines qui soit altéré en absence de ERK3 et ceci devrait aussi être vérifié ultérieurement (Figure 17).

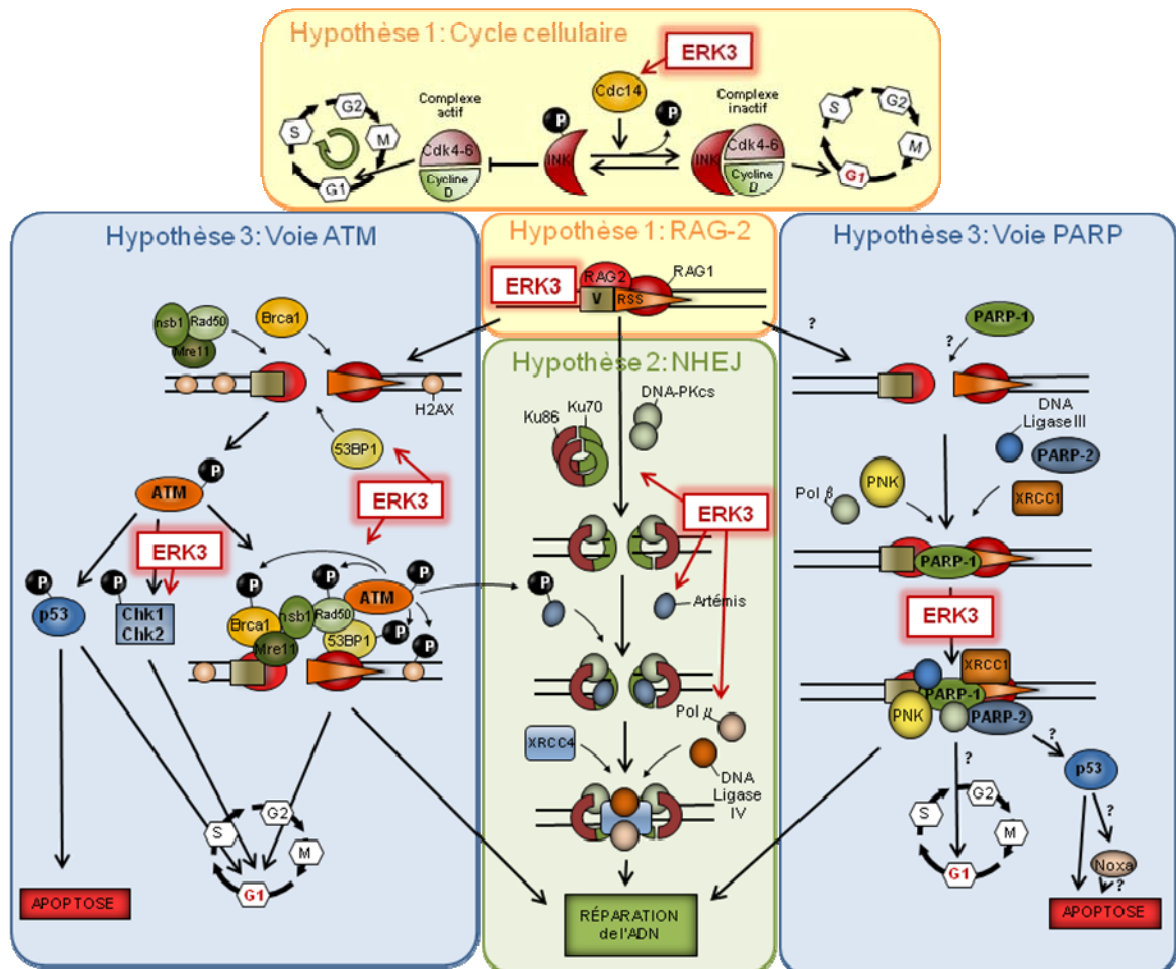


Figure 17: Schéma des hypothèses proposées concernant le rôle de ERK3 à l'étape DP.

Hypothèse 1 : ERK3 contrôle le cycle cellulaire ou l'expression de RAG-2. Hypothèse 2 : ERK3 régule l'expression de certaines molécules du NHEJ au stade DP ou encore, tel que représenté ici, leur recrutement aux DSB suivant le clivage accompli par les enzymes RAG. Hypothèse 3 : ERK3 participe au système de surveillance et de détection des dommages faits à l'ADN pendant la recombinaison V(D)J chez les DP. Tel que représenté ici, cette hypothèse se divise en deux sous-hypothèses. Premièrement (panneau à gauche), soit ERK3 joue un rôle dans l'expression, la phosphorylation ou dans le recrutement des molécules (autres que ATM et H2AX) qui migrent à l'ADN lors de l'apparition de DSB (Brca1, 53BP1, Mre11, nsb1, etc.), soit ERK3 participe à la voie des kinases Chk1/2. Deuxièmement (panneau à droite), ERK3 participe dans une des voies des enzymes PARP p53-indépendante. Puisque cette voie de signalisation est très peu définie chez les LT dans la littérature, les points d'interrogation représentent différents liens qui sont souvent suggérés, mais pas encore démontrés.

Hypothèse 3: ERK3 fait parti du système de surveillance et de détection des dommages faits à l'ADN pendant le réarrangement V(D)J.

Chez les thymocytes DP, ATM est la principale molécule qui orchestre le système de surveillance et de détection des dommages faits à l'ADN et la DNA-PK participe à la réparation des DSB faits dans l'ADN par les enzymes RAG. Il a été montré que ces deux molécules ont toutes deux la capacité de phosphoryler l'histone H2AX lors de l'apparition de DSB dans l'ADN [283, 540, 541]. En plus, il a été observé chez des fibroblastes *Atm*^{-/-} que l'histone H2AX est fortement phosphorylée [542]. Dans cette thèse, nous avons montré que l'abolition de ERK3 chez les DP entraîne une augmentation significative de la phosphorylation de l'histone H2AX (Article I, Figure 5). Nous pouvons exclure la possibilité que ERK3 participe à la même voie de signalisation que la DNA-PK puisque l'abolition de cette dernière cause un blocage complet à l'étape DN3 alors que nous n'observons aucune altération à cette étape chez la souris *Erk3*^{-/-}. Par contre, chez la souris *Atm*^{-/-}, tout comme chez la souris *Erk3*^{-/-}, seul un blocage à l'étape DP est observé [288, 289]. De façon intéressante, plusieurs phénotypes observés chez la souris *Atm*^{-/-} corrèlent avec ceux observés chez la souris *Erk3*^{-/-} (diminution du nombre de DP et blocage entre les étapes DP RCT^{faible}/DP RCT^{int}) [288, 289]. Serait-il possible que ERK3 et ATM participent dans la même voie de signalisation ou bien est-ce que ERK3 et ATM sont situées dans deux voies de signalisation distinctes qui régulent sensiblement les mêmes phénomènes chez les DP? Afin de répondre à cette question, il faudrait réaliser une expérience dans laquelle ces deux molécules sont abolies simultanément pour observer l'effet résultant. Par exemple, en croisant les souris *Atm*^{-/-} avec les souris *Erk3*^{-/-} il serait possible d'observer si le blocage en DP est exacerbé (deux voies différentes) ou s'il demeure le même (les deux molécules sont dans la même voie de signalisation). Dans cette situation, si le blocage est inchangé, serait-il possible que ERK3 régule ATM ou ce serait plutôt l'inverse? Selon les informations disponibles actuellement, il est plus vraisemblable qu'ATM contrôle ERK3 que le contraire. Effectivement, les souris *Atm*^{-/-} présentent plusieurs phénotypes associés à

l'altération des différentes voies de signalisation qu'elle contrôle, alors que ces phénotypes ne sont pas tous observés chez la souris *Erk3*^{-/-}. Par exemple, la souris *Atm*^{-/-} développe des lymphomes thymiques à partir de l'âge de 2 mois et ce phénomène ne fut pas observé chez les chimères hématopoïétiques *Erk3*^{-/-} et ce, même 10 mois suivant leur reconstitution [287, 543]. De plus, deux différentes études ont montré chez la souris *Atm*^{-/-} que le réarrangement du locus *Tcra* à l'étape DP est altéré, alors que nous n'avons observé aucune diminution de l'expression de l'ARNm de ce dernier par PCR quantitatif en temps réel chez les DP *Erk3*^{-/-} [288, 289].

Dans quelle voie de signalisation contrôlée par ATM pourrait être situé ERK3? Tel que discuté dans l'introduction, ATM régule deux différents mécanismes chez la cellule suivant l'apparition de DSB : l'activation du point de contrôle en G₁/S et l'apoptose. Effectivement, ATM active une voie p53-dépendante qui permet d'éliminer les cellules qui accumulent des aberrations chromosomiques ainsi que des DSB non-réparés. Cette information est appuyée par le fait que les souris *Atm*^{-/-} et les souris *p53*^{-/-} développent des lymphomes [544, 545]. À partir des résultats que nous avons obtenus, il est peu probable que ERK3 participe à la voie de signalisation p53-dépendante. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'apoptose chez les DP RCT^{fort} *Erk3*^{-/-}, ainsi qu'une augmentation importante de l'expression de l'ARNm de la molécule pro-apoptotique Noxa. Il a été démontré que Noxa est principalement induite suivant des dommages faits à l'ADN et que son expression est majoritairement p53-dépendante [281]. De plus, la souris *Erk3*^{-/-} ne développe aucun lymphome, ce qui indique aussi que l'activité de p53 devrait être normale. Évidemment, pour valider cette possibilité, l'expression de p53 devrait être mesurée chez les DP *Erk3*^{-/-}. Si p53 est exprimé normalement chez les DP *Erk3*^{-/-}, cela pourrait signifier que ERK3 est impliqué dans l'activation du point de contrôle G₁/S à cette étape. Dans l'hypothèse 1, j'ai suggéré que l'augmentation de la proportion de DP *Erk3*^{-/-} en phase S pouvait signifier soit que les DP *Erk3*^{-/-} prolifèrent et meurent davantage que les DP *Erk3*^{+/+} ou soit que ce sont les DP qui ne prolifèrent pas qui sont éliminés chez la souris *Erk3*^{-/-}. Il existe une explication alternative à ce résultat qui appuie l'hypothèse que ERK3 est

impliqué dans un point de contrôle du cycle cellulaire pendant le réarrangement V(D)J. En effet, une accumulation de cellules en phase S peut aussi signifier que le point de contrôle G₁/S du cycle cellulaire est défectueux. Effectivement, il a été montré que les thymocytes d'une souris *Atm*^{-/-} irradiée s'accumulent massivement en phase S [546]. Afin de déterminer si ERK3 participe dans le point de contrôle G₁/S, il serait pertinent d'évaluer l'expression des différentes molécules impliquées dans ce phénomène et activées par ATM telles que Chk1, Chk2, Brca1, 53BP1, Mre11, etc. chez les DP *Erk3*^{-/-} (Figure 17) [547].

Évidemment, à cette étape de la présente étude, il est tout aussi possible que ERK3 ne soit pas située dans aucune des voies de signalisation régulées par ATM. Il a été démontré que la famille des poly (ADP-ribose) polymérases (PARP) comprend actuellement 17 membres et ces derniers interviennent dans des processus biologiques divers tels que la réparation de l'ADN, la transcription, la ségrégation mitotique, l'homéostasie des télomères et la mort cellulaire [548]. A ce jour, seules PARP-1 et PARP-2 s'avèrent dépendantes des cassures dans l'ADN pour leur activation. En effet, Il a été montré que PARP-1 est un senseur moléculaire de cassures dans l'ADN puisqu'elle joue un rôle-clé dans l'organisation spatiale et temporelle de leur réparation en synthétisant localement du poly(ADP-ribose), une molécule de signalisation et de recrutement des facteurs de réparation au site endommagé [265]. Il a été montré que les PARP détectent les cassures dans l'ADN et les signalent immédiatement ce qui déclenche le recrutement de facteurs de réparation comme XRCC1. La mutation de PARP-1 ou de PARP-2 chez la souris n'entraîne pas la mort *in utero*, mais ces souris mutantes présentent une sensibilité accrue à différents agents qui endommagent l'ADN [548]. Par contre, la double mutation *Atm*^{-/-};*Parp-1*^{-/-} ou *Atm*^{-/-};*Parp-2*^{-/-} entraîne la mort très tôt au cours de l'embryogenèse, ce qui suggère que ces deux voies agissent en parallèle pour le maintien de l'intégrité du génome pendant le développement de la souris [548, 549]. De plus, il a été démontré chez la souris *Atm*^{-/-} que l'activité des PARP est normale, ce qui confirme que ces deux molécules sont situées dans deux voies de signalisation indépendantes [550]. Il a été montré que les PARP interviennent lors du réarrangement V(D)J en coopérant avec la DNA-PK [551]. Finalement, l'abolition de

Parp-2 chez la souris entraîne un phénotype thymique similaire à celui observé chez la souris *Atm*^{-/-} ainsi que chez la souris *Erk3*^{-/-}. En plus, la souris *Parp-2*^{-/-} partage d'autres phénotypes avec la souris *Erk3*^{-/-} tels qu'un accroissement de la mort par apoptose en DP et une augmentation de la proportion mais pas du nombre de DP en phase S, ainsi qu'une augmentation spécifique de l'expression de *Noxa* [263]. Par contre, les souris *Atm*^{-/-} et *Parp-2*^{-/-} exhibent toutes deux une altération dans l'expression de *Tcra* alors que ce phénotype n'est pas observé chez la souris *Erk3*^{-/-}. Malgré tout, vu la concordance entre nos résultats et ceux observés chez la souris *Parp-2*^{-/-}, il est tout aussi possible de spéculer que ERK3 pourrait faire parti de la voie de signalisation des PARP que de celles qui sont régulées par ATM. Évidemment, cette éventualité pourra être mise à jour seulement suite à la réalisation des expériences proposées ci-haut pour les voies ATM-dépendantes, ainsi que d'autres expériences telles que de procéder à différents croisements de souris (ex. *Parp-2*^{-/-}; *Erk3*^{-/-}), d'évaluer l'expression des différentes molécules recrutées par l'activité des PARP (XRCC1, Lig3, PNK) ou encore de mesurer directement l'activité des PARP chez les DP *Erk3*^{-/-} (Figure 17).

A la lumière de ces informations, il est difficile actuellement de trancher sur la fonction spécifique de ERK3 à l'étape DP du développement des LT. Tel que suggéré dans cette partie de la discussion, plusieurs expériences devront être réalisées afin de tirer une conclusion définitive. Toutefois, il est important de réaliser qu'avant cette étude, rien n'indiquait que ERK3 pouvait jouer un rôle dans le développement thymique.

Question 1: Quelle est la fonction de ERK3 au stade DN1?

Chez la souris *Erk3*^{-/-}, nous avons observé une diminution statistiquement significative du nombre de DN1 qui est autonome aux thymocytes (Article I, Figures 2 et 6). Tel que discuté dans l'introduction, l'étape DN1 est constituée d'un groupe assez hétérogène de cellules et il existe très peu d'informations à son sujet, car son très faible nombre cellulaire rends ardue l'étude de cette population. Toutefois, l'équipe de Petrie a réussi à déterminer qu'il existe au moins 5 différentes sous-populations à l'étape DN1 et

elles ont été nommées DN1a à DN1e [146]. Ces sous-populations sont définies selon leur fréquence numérique au sein du groupe DN1, leur phénotype, ainsi que leur capacité fonctionnelle tel que résumé dans le Tableau I. Les DN1a sont les plus immatures et les moins fréquents au sein du groupe (~1.4% des DN1) et les ETP en font parti [146]. Les DN1e sont les plus matures du groupe, puisqu'ils expriment le récepteur à l'IL-7 et possèdent des réarrangements géniques D-J β , ce qui est aussi caractéristique des DN2 [146]. Puisque nous avons préalablement observé que *Erk3* est exprimé spécifiquement chez les ETP (Article I, Figure S1), nous avons entrepris de vérifier si ces derniers sont altérés en absence de *Erk3*. Nous avons montré que leur proportion, leur nombre ainsi que leur capacité à générer efficacement un développement T complet ne sont pas altérés en absence de cette MAPK (Article I, Figure 3E à F). Ces résultats suggèrent que les ETP ne sont pas affectées par l'absence de *Erk3*.

Tableau I. Sous-populations DN1 (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁻)

Sous-groupe	% des DN1	Phénotype	Autres potentiels? (LB/DC/NK)	Prolifération (oui/non)	Autres distinctions
DN1a	1.4 \pm 0.9	CD117 ^{hi} CD24 ⁻ CD127 ⁻ CD90 ⁻	Oui	Oui	Non
DN1b	11.2 \pm 2.7	CD117 ^{hi} CD24 ^{lo} CD127 ⁻ CD90 ⁻	Oui	Oui	Non
DN1c	14.2 \pm 5.0	CD117 ⁺ CD24 ⁺ CD127 ⁻ CD90 ^{-/+}	Oui	+/-	Faible expression de <i>Cd3e</i>
DN1d	18.5 \pm 5.0	CD117 ⁻ CD24 ⁺ CD127 ⁻ CD90 ⁺	Oui	Non	Forte expression de <i>Cd3e</i>
DN1e	54.8 \pm 16.0	CD117 ⁻ CD24 ⁻ CD127 ⁺ CD90 ^{-/+}	Non	Non	Forte expression de <i>Cd3e</i> et réarrangement D-J β détectables

Alors, quelle pourrait-être l'identité de la sous-population affectée dans notre étude? Chez la souris *Erk3*^{-/-}, nous observons une diminution significative du nombre total de DN1, ce qui suggère possiblement que c'est la sous-population qui a la plus forte proportion (DN1e : 55%) qui est affectée par l'absence de *Erk3*. Les DN1e sont des cellules qui ne prolifèrent pas et par conséquent, elles sont en phase G₁ du cycle cellulaire [146]. De plus et tel que mentionné ci-haut, il a été montré que ces cellules sont les seules parmi les DN1 à posséder des réarrangements géniques D-J β et elles expriment de faibles niveaux de *Rag-1* [146, 173, 251, 552]. Par contre, il a été suggéré que ces cellules ne donnent pas naissance aux DN2 puisque bien que ces dernières ont la capacité de se différencier en DP, elles ne prolifèrent pas massivement comme les DN2 lorsqu'elles sont cultivées avec les cellules OP9-DL1 [146]. Malgré que l'identité précise de ces thymocytes atypiques soit inconnue, puisque les caractéristiques de ces dernières ressemblent étrangement à celles des DP qui débutent la recombinaison de leur locus *Tcra*, serait-il farfelu de croire que ERK3 pourrait intervenir de la même façon à ces deux différentes étapes du développement intrathymique? Évidemment, il faudrait préalablement évaluer quelle est la sous-population DN1 altérée chez la souris *Erk3*^{-/-}. Mais si ce sont véritablement les DN1e qui sont en cause, est-ce que cela pourrait signifier que ERK3 est requise au tout début du réarrangement des locus D-J (chaînes α et β) et que son véritable rôle est soit de réguler l'arrêt du cycle cellulaire en G₁, ou soit d'intervenir dans les phénomènes précoces de cassures double-brin dans l'ADN? Malheureusement, le développement précoce des souris *Atm*^{-/-} et *Parp-2*^{-/-} n'a pas été étudié ce qui aurait été révélateur dans le cas présent [263, 288, 289]. Par contre, il est aussi possible que ce soit une autre sous-population (DN1b à d) qui soit affectée par l'absence de *Erk3* et dans ce cas, il faudrait évaluer par exemple si ces cellules possèdent toujours leur capacité proliférative et/ou leur potentiel à générer un autre type cellulaire qu'un LT. Aussi, dans ce cas, puisqu'il existe très peu d'informations au sujet de ces sous-populations de DN1, il est possible que l'expérience la plus simple et la plus révélatrice serait d'évaluer les différences d'expression génique entre la sous-population *Erk3*^{-/-} concernée et sa correspondante *Erk3*^{+/+} par analyse de micropuces d'ADN. Évidemment tout ceci demeure

très hypothétique et plusieurs scénarios sont envisageables puisque nous avons seulement survolé l'étape DN1 chez les souris *Erk3*^{-/-} dans cette thèse.

Question 2: Quel est le rôle de ERK3 dans le développement des SP CD4⁺?

Dans l'article I, nous avons tout d'abord montré chez les nouveau-nés *Erk3*^{-/-} une absence presque totale de SP CD4⁺ (Article I, Figure 2). Ensuite, avons observé dans des FTOC que la proportion et le nombre de SP CD4⁺ *Erk3*^{-/-} sont toujours diminués significativement comparativement aux mêmes cultures *Erk3*^{+/+} (Article I, Figure 3). De plus, nous avons observé le même phénomène chez les souris *Erk3*^{-/-}/OT-II/*Rag*^{-/-} chez lesquelles nous avons montré un rétablissement presque complet de la cellularité thymique (résultats non-montrés et Article I, Figure 5G). Aussi, ces mêmes FTOC nous ont permis d'observer que le nombre de SP CD8⁺ est presque normal en absence de ERK3 (Article I, Figure 3), indiquant que cette dernière intervient plus spécifiquement dans le développement des SP CD4⁺. Par la suite, nous avons créé des chimères hématopoïétiques *Erk3*^{-/-} et dans celles-ci, la diminution de SP CD4⁺ ne fut pas observée, ceci indiquant que cette observation n'est pas autonome aux thymocytes (Article I, Figure 6). Nous avons alors postulé que l'épithélium thymique devait intervenir dans ce phénomène et nous avons greffé des thymus fœtaux *Erk3*^{-/-} exempt de thymocytes sous la capsule du rein de souris MHCII-déficientes et ce, afin d'éviter que l'analyse des résultats soit faussée par la présence des LT CD4⁺ recirculants qui originent de l'hôte [553]. Étonnamment, nous avons observé un développement SP CD4⁺ normal dans les greffons *Erk3*^{-/-} (Article I, Figure 6F). Comment expliquer toutes ces observations? Est-ce que l'abolition de ERK3 dans l'épithélium thymique ainsi que dans les thymocytes est requise pour que le développement SP CD4⁺ soit altéré ou existe-t-il une explication alternative? De plus, serait-il possible que ERK3 soit impliquée dans le choix d'engagement vers la lignée SP CD4⁺ tout comme les facteurs de transcription GATA-3, Th-POK ou TOX?

Premièrement, en comparant les différents phénotypes résultants de l'abolition de chacun des facteurs de transcription requis pour l'engagement vers la lignée SP CD4⁺ avec ceux

que nous avons obtenus chez la souris *Erk3*^{-/-}, il serait assez surprenant que ERK3 soit un nouveau facteur requis pour l'engagement SP CD4⁺. Tout d'abord, chez la souris HD, ainsi que la souris *Th-pok*^{-/-}, il est observé que le blocage en SP CD4⁺ redirige les cellules vers la lignée SP CD8⁺ [370, 554]. Donc, chez ces dernières, le nombre et la proportion de SP CD8⁺ sont fortement augmentés, alors que ceci n'est pas observé chez les FTOC *Erk3*^{-/-}. De plus, la même augmentation de SP CD8⁺ a été observée chez la souris conditionnellement déficiente pour *Gata3* que chez la souris *Th-pok*^{-/-} [554]. Pour sa part, la souris *Tox*^{-/-} ne présente pas d'augmentation du nombre de SP CD8⁺, mais plutôt une absence totale de SP CD4⁺ ainsi qu'une diminution marquée de la sélection positive (diminution de l'expression de CD69) [555]. Au contraire, chez la souris *Erk3*^{-/-}, le développement des SP CD4⁺ n'est pas totalement aboli et l'expression de CD69 est normale. Finalement, c-myb a aussi été identifiée comme importante dans l'engagement des SP CD4⁺. Tel que mentionné dans l'introduction, c-myb est essentielle à l'engagement précoce vers la lignée T, mais lorsqu'elle est inactivée conditionnellement à différentes étapes du développement thymique, il a été observé qu'elle est aussi requise en DN3, en DP ainsi que pour l'engagement vers la lignée SP CD4⁺ [159, 163]. De plus, il a été montré que sa mutation spécifique en SP CD4⁺ sur un fond transgénique OT-II entraîne une diminution marquée des SP CD4⁺ ainsi qu'une réduction massive du nombre total de thymocytes [159]. En comparaison, chez les nouveau-nés *Erk3*^{-/-}OT-II/*Rag*^{-/-}, nous avons observé une diminution de la proportion de SP CD4⁺, mais le nombre total de thymocytes est normal. Finalement, l'effet de chacune de ces mutations sur le développement SP CD4⁺ est autonome aux LT, alors que nous n'observons rien d'anormal à l'étape SP CD4⁺ chez les chimères *Erk3*^{-/-}. Puisque nous n'observons aucun des phénotypes décrit dans ces différentes souris mutantes, il s'avère peu probable que ERK3 soit un régulateur du choix SP CD4⁺. Alors, quelle pourrait être la fonction de ERK3 dans le développement des SP CD4⁺?

Peu d'informations sont disponibles actuellement pour tenter d'expliquer le phénomène que nous observons en SP CD4⁺ chez la souris *Erk3*^{-/-}. Certains facteurs sont essentiels pour le développement spécifique des SP CD4⁺ tels que les facteurs énumérés ci-haut, ainsi que

l'expression du CHMII par les TEC. Nous avons observé que les TEC expriment *Erk3* (résultats non-montrés), alors serait-il possible que les TEC *Erk3*^{-/-} expriment moins de CMHII à leurs surface? Ceci est peu probable puisque dans ce cas, nous aurions observé une diminution de SP CD4⁺ à l'intérieur des greffons *Erk3*^{-/-}. Bien que dans l'article I nous suggérons que l'abolition simultanée de ERK3 dans l'épithélium thymique et dans les thymocytes est requise pour observer une altération du développement SP CD4⁺, il existe toutefois une explication alternative à tous ces résultats. En effet, peut-être que les thymocytes SP CD4⁺ *Erk3*^{-/-} se développent moins rapidement que des thymocytes normaux et que cela n'est pas dépendant de l'abolition de *Erk3* dans les TEC. Effectivement, le développement thymique observé chez les nouveau-nés ainsi que chez les FTOC représentent la toute première vague de thymocytes à entrer dans le thymus. Chez ces derniers, nous avons observé une diminution importante de SP CD4⁺ et non pas une abrogation de leur développement. Au contraire, chez les chimères hématopoïétiques ainsi que chez les greffons, plusieurs vagues de thymocytes ont eu le temps de passer à travers le thymus puisque ces derniers ont été analysés au minimum 8 semaines post-reconstitution ou post-greffe, alors qu'un développement thymique complet prend environ 3 semaines. Il est donc possible d'imaginer dans ce cas que si le développement des SP CD4⁺ *Erk3*^{-/-} est ralenti, cela peut difficilement s'observer chez les chimères ou chez les greffes puisque chez ces dernières, l'espace disponible pour les SP CD4⁺ a eu le temps de se remplir et de se vider en processus continu. Évidemment, ceci demeure hypothétique, mais pourrait être vérifié à l'aide des deux expériences suivantes. La première, qui est aussi la plus simple, consisterait à réaliser une cinétique de culture de FTOC *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+} dans le temps et évaluer chez chacune l'apparition graduelle des SP CD4⁺. La deuxième consisterait à reconstituer des souris irradiées de façon létale à l'aide de différentes proportions de cellules *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+} (par exemple 50:50, 75:25, 25:75, etc.) afin d'induire une compétition entre ces deux population pour l'espace disponible dans le thymus. Si le développement des SP CD4⁺ est réellement ralenti ou altéré en absence de *Erk3*, alors les SP CD4⁺ *Erk3*^{+/+} occuperont plus rapidement l'espace disponible et ainsi empêcheront les

SP CD4⁺ *Erk3*^{-/-} de s'y établir. Il faudrait ensuite essayer d'expliquer le rôle de ERK3 dans ce phénomène et vu le manque d'information sur ce sujet dans la littérature, la façon la plus appropriée serait de comparer le profil d'expression génique des SP CD4⁺ *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} par analyse de micropuces d'ADN. Finalement, la création d'un modèle *Erk3*-déficient conditionnel aiderait probablement à mieux définir et comprendre ces phénomènes.

Question 3: Quels sont les partenaires de ERK3?

Au cours de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que puisque ERK4 est la MAPK possédant la plus forte homologie avec ERK3, il est possible que ERK4 compense partiellement pour l'absence de *Erk3* chez les LT. Nous avons premièrement démontré que la mutation concomitante de ERK3 et de ERK4 n'entraîne pas une altération plus sévère du développement thymique (Article I, Figure S5). Ensuite, nous avons analysé le développement thymique d'une souris *Erk4*^{-/-} et nous n'avons observé aucun phénotype anormal (résultats non-montrés). Finalement, nous avons montré qu'aucune expression de *Erk4* n'est observée chez les LT activés *in vitro* (Article II, Figure 6). Ces résultats démontrent que ERK4 ne joue aucun rôle dans la vie d'un LT et que cette dernière ne compense pas pour l'absence de ERK3.

Tel que mentionné dans l'introduction, quelques partenaires ont été identifiés ultérieurement pour ERK3 tels que la kinase MK5, la cycline D3, la phosphatase Cdc14A ainsi que la protéine MAP2. Nous avons montré que le développement thymique d'une souris *Mk5*^{-/-} est normal (Article I, Figure 7). Par contre, il faut être prudent avec l'interprétation de ce résultat, puisque nous avons effectué cette expérience chez des souris *Mk5*^{-/-} et *Mk5*^{+/+} dont le fond génétique est inconnu et ce dernier peut grandement influencer le phénotype observé. En effet, il a été montré que sur un fond génétique C57BL/6, la souris *Mk5*^{-/-} décède *in utero*, alors que sur un fond génétique mixte, elle survit à la naissance et se reproduit normalement [87, 91]. De plus, il est possible que ERK3 et MK5 n'interagissent pas au cours du développement des LT, mais que ces deux kinases soient toutes deux essentielles pour la prolifération des LT périphériques suivant leur activation.

Pour sa part, la cycline D3 n'est requise qu'à l'étape DN3 pour la prolifération des cellules β -sélectionnées, ce qui ne corrèle pas avec nos résultats chez la souris *Erk3*^{-/-} et donc nous permet de l'exclure de la quête d'identification des partenaires/voie de signalisation de ERK3 chez les thymocytes [224]. Aussi, tel que suggéré dans l'hypothèse 1 de cette section, il serait possible que la phosphatase Cdc14A soit impliquée avec ERK3 dans le développement des LT, mais ceci est à prouver puisqu'il n'existe actuellement aucune étude montrant l'impact physiologique de la mutation de cette phosphatase chez le mammifère. Ces informations et résultats démontrent que l'identité de la voie de signalisation ou encore des partenaires de ERK3 chez les LT sont bien différents de ceux identifiés chez d'autres types cellulaires dans la littérature. L'identification des partenaires de ERK3 au cours de la vie d'un LT devrait être une des priorités dans la suite de ce projet pour comprendre et identifier précisément la voie de signalisation et le rôle de cette MAPK atypique dans le développement et l'activation des LT. Pour identifier les partenaires qui interagissent avec ERK3, il faudrait utiliser la technique de chromatographie liquide pour isoler ERK3 ainsi que ses partenaires à partir d'extraits protéiques de DP ou de LT activés. Ensuite, l'identité de ces protéines pourrait être révélée par électrophorèse sur gel à deux dimensions. Ces interactions pourraient ensuite être validées par co-immunoprécipitation ou par co-transfection dans des lignées de cellules T ou encore dans des thymomes. Évidemment, si une souris déficiente pour une de ces molécules préalablement identifiées existe, il sera pertinent d'évaluer le développement thymique ainsi que l'activation des LT chez ce modèle animal.

ERK3 et la biologie des LT périphériques

Introduction

Suivant la création de chimères hématopoïétiques *Erk3*^{-/-}, nous avons tout d'abord observé que ERK3 n'est pas requise pour l'homéostasie des LT périphériques et que le

répertoire des LT sortis du thymus est polyclonal et normal (Article II, Figures 3 et S1). Par contre, nous avons démontré que ERK3 est requise lors de l'activation des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ *in vitro* afin qu'ils prolifèrent et produisent normalement des cytokines (Article II, Figure 4). En corrélation avec ces résultats, nous avons observé que *Erk3* n'est pas exprimée chez les LT fraîchement isolés, alors que son expression débute 6 heures suivant l'activation du RCT et atteint son apogée de 24 à 48 hrs post-activation (Article II, Figure 1). De plus, nous avons montré dans l'article II que les LT *Erk3*^{-/-} activés ne sont pas plus sensibles à l'apoptose que les LT *Erk3*^{+/+}, mais qu'ils expriment toutefois moins de facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Article II, Figure 5). Avec ces résultats, nous avons proposé que ERK3 n'est pas requise pour la survie des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ activés, mais plutôt pour maintenir leur état d'activation/prolifération. Ces résultats permettent d'attribuer pour la première fois un rôle pour ERK3 dans l'activation des LT *in vitro*. Bien entendu, cette étude ne représente que le commencement du défrichage et ouvre la porte sur un large éventail de questions et d'expériences à accomplir pour identifier le rôle exact de ERK3 dans l'activation des LT naïfs. Dans la section suivante, deux questions directement reliées aux résultats obtenus dans l'article II seront présentées et discutées.

Questions/perspectives et discussion

Question/perspective 1: Quel est le rôle spécifique de ERK3 dans l'activation des LT?

Premièrement, nous avons montré qu'une abolition de ERK3 entraîne une altération de la prolifération *in vitro* chez les LT suivant leur activation à l'aide d'anti-CD3 et ce dans un contexte où la costimulation est présente. Maintenant, est-ce que ERK3 est requis *in vivo* pour l'activation des LT naïfs? Pour répondre clairement à ces questions, il faudrait réaliser quelques expériences supplémentaires. Une façon simple de répondre à cette interrogation serait d'immuniser des chimères *Erk3*^{-/-} avec un pathogène, par exemple LCMV pour étudier les LT CD8⁺, et d'observer, entre autre, la phase d'expansion clonale dans les organes lymphoïdes secondaires, si des LT effecteurs sont formés chez ces souris et aussi

investiguer si les fonctions effectrices des LT *Erk3*^{-/-} sont normales *in vitro*. De plus, une autre façon d'observer si la prolifération cellulaire est affectée en absence de *Erk3* serait soit d'évaluer l'expression de Ki-67, une molécule exprimée pendant toutes les phases du cycle cellulaire sauf à l'étape G₀/G₁, ou encore d'injecter les chimères ERK3-déficientes avec du BrdU suivant l'infection et de regarder si la proportion de cellules en prolifération générée pendant la phase d'expansion est la même que chez les chimères *Erk3*^{+/+}. Ces quelques expériences permettraient démontrer si ERK3 est requis *in vivo* pour l'activation des LT. Une autre question qui demeure sans réponse est : suivant leur activation, est-ce que les LT *Erk3*^{-/-} ont la capacité de se différencier en LTm et de produire une réponse immunitaire efficace lors d'une deuxième rencontre avec le même pathogène? Il est probable qu'*in vivo* aucun défaut de prolifération des LT ne sera observé chez la souris ERK3-déficiente puisqu'il existe plusieurs molécules redondantes qui régulent les événements essentiels tels que la prolifération chez la cellule. Par contre, il est tout aussi possible que l'activité de ERK3 dans le contexte de l'activation des LT soit unique et dans ce cas, il est probable qu'une diminution marquée de la prolifération cellulaire au cours de l'expansion clonale altère le développement des LTm. Ces quelques questions démontrent clairement qu'il reste encore beaucoup de travail à réaliser afin d'élucider le rôle précis de ERK3 dans l'activation des LT.

Il est important de souligner ici qu'en fonction de ce qui est connu actuellement sur ERK3 dans la littérature, il est étonnant que l'abolition de ERK3 entraîne une altération de la prolifération cellulaire chez les LT activés. Malgré tout, il n'est pas impossible que ERK3 joue de multiples rôles selon le contexte cellulaire en interagissant avec des partenaires différents. Effectivement, ERK3 pourrait être impliquée dans des voies de signalisation différentes, puisque nous avons montré que cette MAPK est requise au tout début de l'étape DP, alors que la signalisation via le RCT n'est pas activée et qu'au contraire, chez les LT périphériques, ERK3 n'est exprimée que suivant l'activation du RCT. Il est intéressant de discuter ici du cas de la cycline D3. Effectivement cette dernière a été identifiée comme un partenaire de ERK3 [94]. Au cours du développement thymique, son abolition ne génère

pas le même phénotype que nous avons observé chez la souris *Erk3*^{-/-}. En effet, la souris cycline D3-déficiente présente un blocage entre les étapes DN3 et DN4. Par contre, il a aussi été montré que cette dernière n'est pas exprimée chez les LT naïfs et que son expression débute suivant l'activation du RCT comme nous avons observé pour ERK3 (Article II, Figure 1) [556]. De plus, il a été montré que les LTm CD8⁺ sont dans un état de quiescence provisoire, puisqu'ils expriment fortement la cycline D3 pendant qu'ils sont en phase G₁ du cycle cellulaire [556]. Les auteurs de cet article ont suggérés que l'expression de la cycline D3 pourrait être nécessaire aux LTm pour maintenir ces derniers dans un état de préactivation afin qu'ils soient plus rapide à intervenir s'ils rencontrent le même pathogène une seconde fois. Dans ce contexte, il est possible de croire que ERK3 pourrait interagir avec la cycline D3 seulement lors de l'activation des LT pour contrôler leur prolifération, et en plus d'émettre l'hypothèse qu'*in vivo*, en absence de ERK3, les LTm CD8⁺ vont être moins efficaces pour répondre à une seconde stimulation antigénique.

Question/perspective 2: Pourquoi l'expression de Bcl-2 est diminuée chez les LT Erk3^{-/-}?

Nous avons observé que les niveaux d'expression de Bcl-2 sont plus faibles chez les LT *Erk3*^{-/-} que chez les LT *Erk3*^{+/+} 48 heures suivant leur activation (Article II, Figure 5). De plus, nous avons montré que la mort cellulaire des LT *Erk3*^{-/-} n'est pas augmentée 24, 48 et 72 heures post-activation. Comment corréler ces observations? Premièrement, il est possible que la diminution de Bcl-2 soit seulement un effet secondaire de la baisse de production d'IL-2 chez les LT *Erk3*^{-/-}, puisqu'il a déjà été démontré que la quantité d'IL-2 présente influence directement la quantité de Bcl-2 exprimée [557, 558]. En effet, il a été montré que l'ajout d'IL-2 pendant l'activation des LT entraîne une augmentation de l'expression de Bcl-2, alors qu'en absence d'IL-2, Bcl-2 n'est presque pas exprimée et les cellules ne survivent pas. Dans le cas présent, ceci signifierait que la diminution d'expression d'IL-2 chez les LT *Erk3*^{-/-} entraînerait la diminution de la production de Bcl-2, mais que cette diminution ne serait pas suffisante pour causer l'apoptose des cellules. Afin de vérifier cette possibilité, il faudrait ajouter de l'IL-2 lors de l'activation des LT

Erk3^{-/-} et évaluer si le niveau d'expression de Bcl-2 redevient équivalent à celui observé chez les LT *Erk3*^{+/+}. De plus, c'est la balance entre l'inhibition de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-X_L) et l'activation de facteurs pro-apoptotiques (Bim) qui entraîne l'apoptose des LT. Ceci suggère que bien que l'expression de Bcl-2 soit diminuée chez les LT *Erk3*^{-/-}, il est probable que Bim ne soit pas exprimé ou encore que Bcl-X_L compense pour la diminution de Bcl-2 et c'est pourquoi nous n'observons aucune apoptose *in vitro* chez les LT *Erk3*^{-/-}. Toutefois, il a déjà été observé que des LB *Bcl-2*^{-/-} meurent massivement *in vivo* alors qu'*in vitro* les mêmes cellules n'avaient présenté aucune apoptose [559, 560]. Dans ce cas, serait-il possible que la diminution de Bcl-2 que nous observons *in vitro* chez les LT *Erk3*^{-/-} activés leur soit fatale *in vivo*? De plus, la diminution d'expression de Bcl-2 est plus marquée chez les LT CD8⁺ *Erk3*^{-/-} activés que chez les LT CD4⁺ *Erk3*^{-/-} activés (Figure 5B). Par conséquent, puisqu'il a été montré que les LTm CD8⁺ expriment plus de Bcl-2 que les LT CD8⁺ naïfs et que les LTm CD4⁺, est-ce que la diminution d'expression de Bcl-2 observée chez les LT CD8⁺ *Erk3*^{-/-} activés pourrait nuire *in vivo* à la génération ou encore à la survie des LTm CD8⁺ [561]?

Tel que rapporté dans cette sous-section de la discussion, beaucoup de questions demeurent sans réponse concernant le rôle de ERK3 dans l'activation des LT. Heureusement, ces dernières pourront être répondues ultérieurement grâce l'immunisation des chimères *Erk3*^{-/-} tel que proposé ci-haut.

Perspectives générales

Au départ cette discussion fut orientée sur les articles contenus dans cette thèse et l'objectif a été de compléter les discussions de ces derniers, ainsi que de soulever certaines questions qui sont directement reliées à ceux-ci. Maintenant, j'aimerais discuter de questions un peu plus générales concernant ERK3.

Question 1: Est-ce que les fonctions qu'exerce ERK3 au cours de la vie d'un LT sont uniques parmi celles connues chez les autres MAPK?

Tel que mentionné dans l'introduction, les MAPK conventionnelles ERK1/2, p38 α , JNK1/2 et ERK5 jouent des rôles importants au cours du développement thymique ainsi que dans l'activation des LT. Ces dernières sont requises essentiellement au cours du développement des LT pour permettre à l'étape DN3 la prolifération cellulaire (ERK1/2 et p38 α), ainsi que pour la survie/mort lors des sélections thymiques (ERK1/2, p38 α , JNK1/2 et ERK5). Pour sa part, ERK3 est surtout requise au cours du réarrangement V(D)J de la chaîne alpha du RTC survenant pendant la différenciation cellulaire des DP (Figure 16). La tendance actuelle est que ERK3 semble participer à la prolifération des LT CD4⁺ ainsi que des LT CD8⁺ (Figure 18). Parmi les MAPK conventionnelles, ERK2 joue seulement un rôle dans la survie des LT CD8⁺ en phase d'expansion et p38 α ainsi que JNK2 sont toutes deux requises pour la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en cellules T_H1. En plus, p38 α joue un rôle dans la survie des LT CD8⁺ activés, alors que JNK2 favorise plutôt leur prolifération. À partir de ces observations, il est évident que ERK3 est une MAPK qui possède des fonctions essentielles, non-redondantes, uniques et complémentaires aux autres membres de la famille des MAPK au cours de la vie d'un LT (Figure 18).

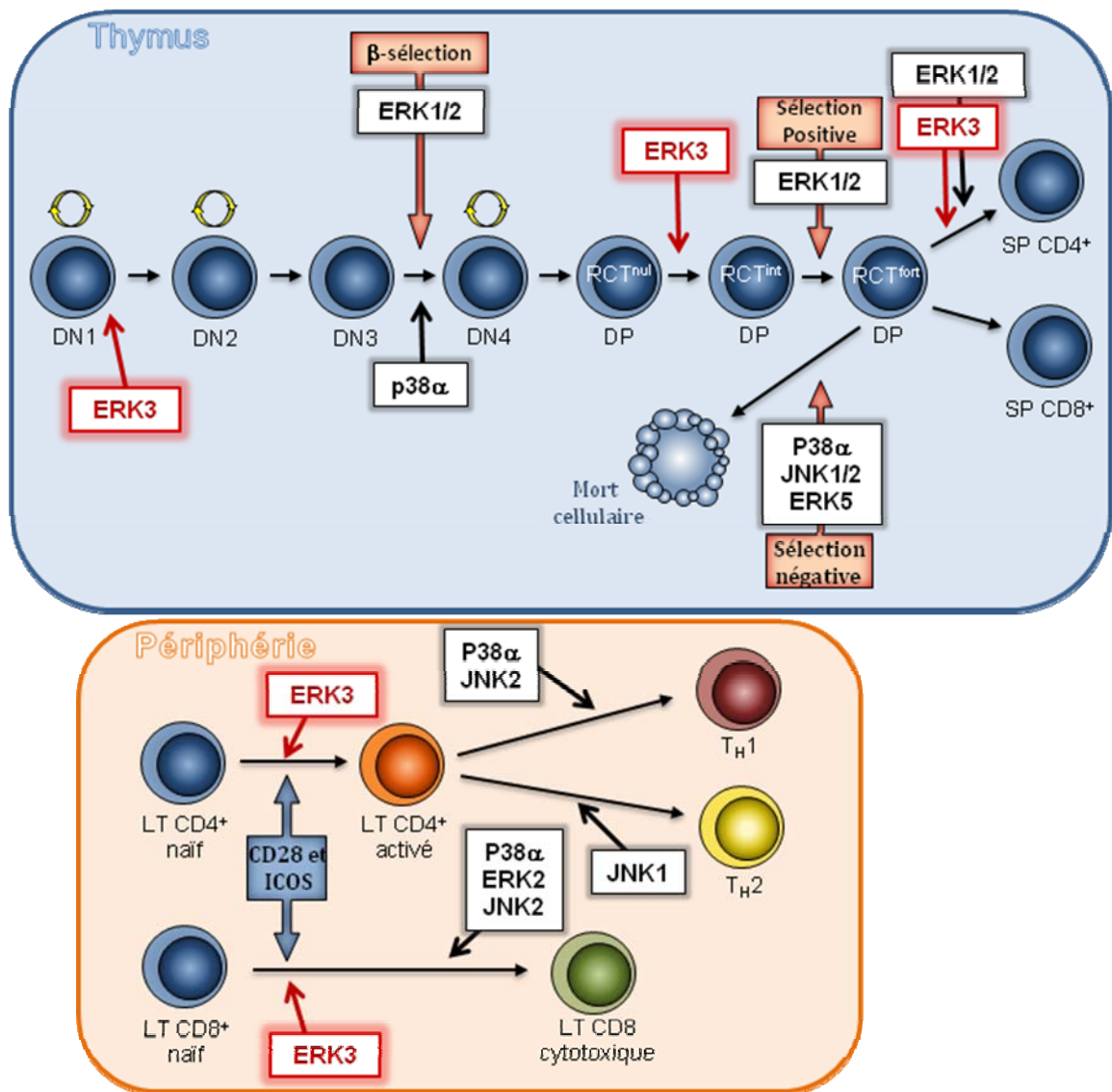


Figure 18: ERK3 joue des rôles uniques parmi les MAPK chez le LT.

Schématisation des étapes au cours du développement intrathymique et lors de l'activation des LT nous avons démontré dans cette thèse que ERK3 joue un rôle. Au cours du développement thymique (haut), ERK3 joue des rôles non-redondants par rapports aux autres MAPK aux étapes DN1 et DP RCT^{faible}. De plus, j'ai observé que ERK3 contribue la différenciation des SP CD4⁺. ERK3 est aussi importante lors de l'activation des LT naïfs CD4⁺ et CD8⁺ pour que ces derniers prolifèrent et/ou se différencient adéquatement (bas). Par soucis de concision et puisqu'aucun rôle n'a encore été démontré pour les MAPK conventionnelles dans leur différenciation, les cellules T_H17 ne sont pas été représentées ici.

Question 2 : Si la souris $Erk3^{-/-}$ survivait au-delà de la naissance que se passerait-il? Est-ce que l'abolition de ERK3 entraînerait des complications/maladies à l'âge adulte ou au contraire absolument rien d'anormal ne serait observé chez ces souris?

Évidemment, aucun modèle animal n'existe actuellement pour répondre à cette question. Toutefois, en reliant plusieurs informations retrouvées dans la littérature, il est possible de faire une proposition : ERK3 pourrait participer aux mécanismes de régulation de la glycémie. Premièrement, il a été démontré que l'abolition de *Atm* chez la souris entraîne de multiples pathologies tel que des tumeurs, différentes formes d'ataxies, ainsi que des déficiences au niveau du système immunitaire [287]. De plus, il a été montré que les souris *Atm*^{-/-} développent un diabète de type II résultant d'une altération dans la sécrétion d'insuline [562]. Ensuite, la possibilité que ERK3 soit situé dans une des voies contrôlées par ATM a été soulevée et commentée au début de cette discussion. Finalement et tel que mentionné dans l'introduction, il a été observé *in vitro* que l'utilisation d'un siRNA ciblant *Erk3* abolie la sécrétion d'insuline dans les îlots pancréatiques du rat [99]. Par conséquent, il est possible que l'abolition conditionnelle de ERK3 chez la souris entraîne l'apparition du diabète de type II. Afin de vérifier cette affirmation, il faudrait premièrement créer une souris chez laquelle le gène *Erk3* serait flanqué de sites loxP et ensuite croiser cette dernière avec la souris RIP-cre [563, 564]. Le résultat serait que *Erk3* serait spécifiquement abolie dans les cellules β du pancréas et ceci permettrait d'observer si les souris *Erk3*^{fl/fl};RIP-cre développent ou non un diabète de type II en vieillissant. Évidemment, ceci n'est qu'un exemple de pathologie qui pourrait être engendrée par l'abolition de *Erk3* à l'âge adulte. Puisque le rôle de ERK3 est fort probablement d'assurer que la différenciation cellulaire se produise normalement lors de processus biologiques précis, il ne serait pas surprenant que cette MAPK atypique jouent d'autres rôles importants au cours de la vie d'un individu.

Conclusion

En conclusion, nos travaux ont porté sur le rôle de ERK3 dans le système immunitaire chez la souris. J'ai démontré que l'abolition de cette MAPK atypique entraîne de multiples altérations au cours du développement et de l'activation des LT. Le phénotype le plus marquant est sans aucun doute l'accumulation des DSB qui sont dépendants des enzymes RAG chez les DP ERK3-déficients. En fait, ceci représente la toute première fonction physiologique précise identifiée dans le système immunitaire pour ERK3 à ce jour.

En plus, ces travaux de thèse ouvrent la voie à de nouvelles avenues de recherche sur le rôle de ERK3 en immunologie puisqu'il a été souligné brièvement dans la discussion que le nombre de LB dans la moelle osseuse est aussi altéré chez la souris *Erk3*^{-/-}. Finalement, ce travail de thèse fait aussi réaliser à quel point les recherches sur ERK3 sont essentielles à la compréhension de certaines pathologies et qu'actuellement nous en sommes seulement à la pointe de l'iceberg des connaissances sur cette MAPK.

Bibliographie

1. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
2. Coulombe, P. and S. Meloche, *Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1376-87.
3. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
4. Robbins, D.J., et al., *Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 5097-106.
5. Payne, D.M., et al., *Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)*. EMBO J, 1991. **10**(4): p. 885-92.
6. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.
7. Nishimoto, S. and E. Nishida, *MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 782-6.
8. Cobb, M.H., *MAP kinase pathways*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 479-500.
9. Boulton, T.G. and M.H. Cobb, *Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies*. Cell Regul, 1991. **2**(5): p. 357-71.
10. Boulton, T.G., et al., *An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control*. Science, 1990. **249**(4964): p. 64-7.
11. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
12. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.
13. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.
14. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. Adv Cancer Res, 1998. **74**: p. 49-139.
15. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
16. Saba-El-Leil, M.K., et al., *An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development*. EMBO Rep, 2003. **4**(10): p. 964-8.
17. Pages, G., et al., *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1374-7.
18. Schramek, H., *MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease*. News Physiol Sci, 2002. **17**: p. 62-7.

19. Arvind, R., et al., *A mutation in the common docking domain of ERK2 in a human cancer cell line, which was associated with its constitutive phosphorylation*. Int J Oncol, 2005. **27**(6): p. 1499-504.
20. Omori, S., et al., *Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1604-14.
21. Joly, D., et al., *The polycystin 1-C-terminal fragment stimulates ERK-dependent spreading of renal epithelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26329-39.
22. Lawrence, M.C., et al., *The roles of MAPKs in disease*. Cell Res, 2008. **18**(4): p. 436-42.
23. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome*. Science, 2006. **311**(5765): p. 1287-90.
24. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17355-63.
25. Kyriakis, J.M., et al., *pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10043-6.
26. Pulverer, B.J., et al., *Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 670-4.
27. Berberich, I., et al., *Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 92-101.
28. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1025-37.
29. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24313-6.
30. Kyriakis, J.M., et al., *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 156-60.
31. Akiba, H., et al., *CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13353-8.
32. Bird, T.A., et al., *Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31836-44.
33. Lenczowski, J.M., et al., *Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 170-81.
34. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-52.

35. Noguchi, K., et al., *Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32580-7.
36. Sabapathy, K., et al., *Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2*. Mech Dev, 1999. **89**(1-2): p. 115-24.
37. Kuan, C.Y., et al., *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron, 1999. **22**(4): p. 667-76.
38. Yang, D.D., et al., *Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene*. Nature, 1997. **389**(6653): p. 865-70.
39. Johnson, G.L. and K. Nakamura, *The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1341-8.
40. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1027-37.
41. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
42. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
43. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.
44. Hu, M.C., et al., *Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7095-102.
45. Lechner, C., et al., *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4355-9.
46. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell, 2004. **117**(6): p. 699-711.
47. Freshney, N.W., et al., *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1039-49.
48. Hazzalin, C.A., et al., *p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient*. Curr Biol, 1996. **6**(8): p. 1028-31.
49. Huang, C., et al., *Vanadium induces AP-1- and NFkappaB-dependent transcription activity*. Int J Oncol, 1998. **13**(4): p. 711-5.
50. Huang, C., et al., *p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12229-35.
51. New, L., et al., *PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3372-84.
52. New, L., et al., *Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1026-32.

53. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.
54. Tan, Y., et al., *FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2*. EMBO J, 1996. **15**(17): p. 4629-42.
55. Whitmarsh, A.J., et al., *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element*. Science, 1995. **269**(5222): p. 403-7.
56. Tanaka, K., et al., *Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury*. J Cell Physiol, 1998. **176**(2): p. 235-44.
57. Adams, R.H., et al., *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 109-16.
58. Lu, H.T., et al., *Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1845-57.
59. Lee, J.D., R.J. Ulevitch, and J. Han, *Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(2): p. 715-24.
60. Zhou, G., Z.Q. Bao, and J.E. Dixon, *Components of a new human protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12665-9.
61. Kasler, H.G., et al., *ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(22): p. 8382-9.
62. Terasawa, K., K. Okazaki, and E. Nishida, *Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway*. Genes Cells, 2003. **8**(3): p. 263-73.
63. Abe, J., et al., *Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16586-90.
64. Kato, Y., et al., *BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 7054-66.
65. Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida, *Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26563-71.
66. English, J.M., et al., *Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3854-60.
67. Pearson, G., et al., *ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7927-31.
68. Hayashi, M., et al., *Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure*. J Clin Invest, 2004. **113**(8): p. 1138-48.
69. Regan, C.P., et al., *Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9248-53.

70. Sohn, S.J., et al., *ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43344-51.
71. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
72. Zhu, A.X., et al., *Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8202-11.
73. Meloche, S., B.G. Beatty, and J. Pellerin, *Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3*. Oncogene, 1996. **13**(7): p. 1575-9.
74. Turgeon, B., M.K. Saba-El-Leil, and S. Meloche, *Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa*. Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 169-75.
75. Gonzalez, F.A., et al., *Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues*. FEBS Lett, 1992. **304**(2-3): p. 170-8.
76. Canagarajah, B.J., et al., *Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation*. Cell, 1997. **90**(5): p. 859-69.
77. Ferrell, J.E., Jr. and E.M. Machleder, *The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in Xenopus oocytes*. Science, 1998. **280**(5365): p. 895-8.
78. Cheng, M., et al., *Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3*. J Biol Chem, 1996. **271**(20): p. 12057-62.
79. Coulombe, P., et al., *Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4542-58.
80. Garcia, J.I., et al., *Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk*. Mamm Genome, 1996. **7**(11): p. 810-4.
81. Hoeflich, K.P., et al., *Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF*. Int J Oncol, 2006. **29**(4): p. 839-49.
82. Zimmermann, J., et al., *Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10759-66.
83. Aberg, E., et al., *Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35499-510.
84. Kant, S., et al., *Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35511-9.
85. Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche, *Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42615-24.

86. Seternes, O.M., et al., *Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4780-91.
87. Schumacher, S., et al., *Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4770-9.
88. Coulombe, P., et al., *N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6140-50.
89. Deleris, P., et al., *Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 778-88.
90. Ni, H., et al., *MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(2): p. 492-6.
91. Shi, Y., et al., *Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7732-41.
92. Sun, P., et al., *PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression*. Cell, 2007. **128**(2): p. 295-308.
93. Anhe, G.F., et al., *ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **251**(1-2): p. 33-41.
94. Sun, M., et al., *Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(1): p. 209-14.
95. Hansen, C.A., J. Bartek, and S. Jensen, *A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3*. Cell Cycle, 2008. **7**(3): p. 325-34.
96. Visintin, R., et al., *The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 709-18.
97. Bartkova, J., et al., *Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation*. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 1027-37.
98. Crowe, D.L., *Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines*. Int J Oncol, 2004. **24**(5): p. 1159-63.
99. Bordin, S., et al., *Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **220**(1-2): p. 41-50.
100. Perander, M., S.M. Keyse, and O.M. Seternes, *Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 4617-24.
101. Choi, K.W. and S. Benzer, *Rotation of photoreceptor clusters in the developing Drosophila eye requires the nemo gene*. Cell, 1994. **78**(1): p. 125-36.
102. Brott, B.K., B.A. Pinsky, and R.L. Erikson, *Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 963-8.

103. Meneghini, M.D., et al., *MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 793-7.
104. Nigg, E.A., *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. Bioessays, 1995. **17**(6): p. 471-80.
105. Kanei-Ishii, C., et al., *Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK*. Genes Dev, 2004. **18**(7): p. 816-29.
106. Ohkawara, B., et al., *Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 381-6.
107. Smit, L., et al., *Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17232-40.
108. Kojima, H., et al., *STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4524-9.
109. Yamaguchi, K., et al., *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction*. Science, 1995. **270**(5244): p. 2008-11.
110. Ishitani, T., et al., *The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 798-802.
111. Hurlstone, A. and H. Clevers, *T-cell factors: turn-ons and turn-offs*. EMBO J, 2002. **21**(10): p. 2303-11.
112. Yasuda, J., et al., *Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB*. Cancer Sci, 2004. **95**(1): p. 52-7.
113. Kortenjann, M., et al., *Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, Nlk*. Eur J Immunol, 2001. **31**(12): p. 3580-7.
114. Abe, M.K., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1301-12.
115. Kuo, W.L., et al., *ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23073-81.
116. Abe, M.K., et al., *ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21272-9.
117. Erickson, A.K., et al., *Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19728-35.
118. Klevernic, I.V., et al., *Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 1): p. 365-73.
119. Qian, Z., et al., *Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1621-7.
120. Miller, J.F., *Immunological function of the thymus*. Lancet, 1961. **2**(7205): p. 748-9.

121. McIntire, K.R., S. Sell, and J.F. Miller, *Pathogenesis of the Post-Neonatal Thymectomy Wasting Syndrome*. *Nature*, 1964. **204**: p. 151-5.
122. Miller, J.F. and D. Osoba, *Current concepts of the immunological function of the thymus*. *Physiol Rev*, 1967. **47**(3): p. 437-520.
123. Hollander, G.A., et al., *Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes*. *Nature*, 1995. **373**(6512): p. 350-3.
124. Shores, E.W., W. Van Ewijk, and A. Singer, *Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment*. *Eur J Immunol*, 1991. **21**(7): p. 1657-61.
125. van Ewijk, W., E.W. Shores, and A. Singer, *Crosstalk in the mouse thymus*. *Immunol Today*, 1994. **15**(5): p. 214-7.
126. van Ewijk, W., et al., *Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets*. *Development*, 2000. **127**(8): p. 1583-91.
127. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(1): p. 31-40.
128. Goldschneider, I., K.L. Komschlies, and D.L. Greiner, *Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors*. *J Exp Med*, 1986. **163**(1): p. 1-17.
129. Scollay, R., J. Smith, and V. Stauffer, *Dynamics of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus*. *Immunol Rev*, 1986. **91**: p. 129-57.
130. Bhandoola, A., et al., *Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from*. *Immunity*, 2007. **26**(6): p. 678-89.
131. Jotereau, F., et al., *Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration*. *J Immunol*, 1987. **138**(4): p. 1026-30.
132. Foss, D.L., E. Donskoy, and I. Goldschneider, *The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice*. *J Exp Med*, 2001. **193**(3): p. 365-74.
133. Jotereau, F.V. and N.M. Le Douarin, *Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life*. *J Immunol*, 1982. **129**(5): p. 1869-77.
134. Donskoy, E. and I. Goldschneider, *Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice*. *J Immunol*, 1992. **148**(6): p. 1604-12.
135. Carramolino, L., et al., *Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs*. *Blood*, 2001. **97**(4): p. 850-7.
136. Uehara, S., et al., *A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2811-9.

137. Wu, L., P.W. Kincade, and K. Shortman, *The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate*. Immunol Lett, 1993. **38**(1): p. 69-75.
138. Rossi, F.M., et al., *Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 626-34.
139. Scimone, M.L., et al., *A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7006-11.
140. Ceredig, R., et al., *Precursors of T cell growth factor producing cells in the thymus: ontogeny, frequency, and quantitative recovery in a subpopulation of phenotypically mature thymocytes defined by monoclonal antibody GK-1.5*. J Exp Med, 1983. **158**(5): p. 1654-71.
141. Fowlkes, B.J., et al., *Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells*. J Exp Med, 1985. **162**(3): p. 802-22.
142. Godfrey, D.I., et al., *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4244-52.
143. Ceredig, R. and T. Rolink, *A positive look at double-negative thymocytes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 888-97.
144. Benlagha, K., et al., *A thymic precursor to the NK T cell lineage*. Science, 2002. **296**(5567): p. 553-5.
145. Hashimoto, Y., et al., *B-cell development in the thymus is limited by inhibitory signals from the thymic microenvironment*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3504-11.
146. Porritt, H.E., et al., *Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 735-45.
147. Balciunaite, G., R. Ceredig, and A.G. Rolink, *The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1930-6.
148. Shortman, K. and L. Wu, *Early T lymphocyte progenitors*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 29-47.
149. Ismaili, J., M. Antica, and L. Wu, *CD4 and CD8 expression and T cell antigen receptor gene rearrangement in early intrathymic precursor cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 731-7.
150. Wu, L., et al., *CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus*. Nature, 1991. **349**(6304): p. 71-4.
151. Allman, D., et al., *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 168-74.
152. Benz, C. and C.C. Bleul, *A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 21-31.

153. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui, *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 9-21.
154. Schmitt, T.M., et al., *Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 469-79.
155. Bell, J.J. and A. Bhandoola, *The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 764-7.
156. Maillard, I., T. Fang, and W.S. Pear, *Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 945-74.
157. Tanigaki, K. and T. Honjo, *Regulation of lymphocyte development by Notch signaling*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 451-6.
158. Han, H., et al., *Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision*. Int Immunol, 2002. **14**(6): p. 637-45.
159. Bender, T.P., et al., *Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 721-9.
160. Emambokus, N., et al., *Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb*. EMBO J, 2003. **22**(17): p. 4478-88.
161. Georgopoulos, K., et al., *The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages*. Cell, 1994. **79**(1): p. 143-56.
162. Gowney, J.D., et al., *Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype*. Blood, 2005. **106**(2): p. 494-504.
163. Lieu, Y.K., et al., *Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14853-8.
164. Scott, E.W., et al., *Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages*. Science, 1994. **265**(5178): p. 1573-7.
165. Spain, L.M., et al., *T cell development in PU.1-deficient mice*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2681-7.
166. Sun, L., A. Liu, and K. Georgopoulos, *Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development*. EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5358-69.
167. Talebian, L., et al., *T-lymphoid, megakaryocyte, and granulocyte development are sensitive to decreases in CBFbeta dosage*. Blood, 2007. **109**(1): p. 11-21.
168. Ting, C.N., et al., *Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 474-8.
169. Yoshida, T., et al., *Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 382-91.
170. Taghon, T.N., et al., *Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling*. Genes Dev, 2005. **19**(8): p. 965-78.
171. Ho, I.C. and S.Y. Pai, *GATA-3 - not just for Th2 cells anymore*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(1): p. 15-29.

172. Porritt, H.E., K. Gordon, and H.T. Petrie, *Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 957-62.
173. Kawamoto, H., et al., *Extensive proliferation of T cell lineage-restricted progenitors in the thymus: an essential process for clonal expression of diverse T cell receptor beta chains*. Eur J Immunol, 2003. **33**(3): p. 606-15.
174. Pear, W.S. and F. Radtke, *Notch signaling in lymphopoiesis*. Semin Immunol, 2003. **15**(2): p. 69-79.
175. Schmitt, T.M., et al., *Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 410-7.
176. Schmitt, T.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 749-56.
177. Besseyrias, V., et al., *Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 331-43.
178. Koch, U., et al., *Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2515-23.
179. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 299-308.
180. Radtke, F., et al., *Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 547-58.
181. Massa, S., et al., *Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro*. Eur J Immunol, 2006. **36**(3): p. 526-32.
182. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
183. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
184. Murre, C., *Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1079-86.
185. Schilham, M.W., et al., *Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3984-91.
186. Lind, E.F., et al., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
187. Masuda, K., et al., *T cell lineage determination precedes the initiation of TCR beta gene rearrangement*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3699-706.
188. Saint-Ruf, C., et al., *Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1208-12.
189. Yui, M.A. and E.V. Rothenberg, *Deranged early T cell development in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5381-91.

190. David-Fung, E.S., et al., *Progression of regulatory gene expression states in fetal and adult pro-T-cell development*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 212-36.
191. Wang, H., et al., *Precocious expression of T cell functional response genes in vivo in primitive thymocytes before T lineage commitment*. Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1623-35.
192. Chen, F., et al., *Differential transcriptional regulation of individual TCR V beta segments before gene rearrangement*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1771-80.
193. Tourigny, M.R., et al., *T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny*. J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1549-56.
194. Ciofani, M., et al., *Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5230-9.
195. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 881-8.
196. Wojciechowski, J., et al., *E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5717-26.
197. Sadofsky, M.J., *Recombination-activating gene proteins: more regulation, please*. Immunol Rev, 2004. **200**: p. 83-9.
198. Oettinger, M.A., *How to keep V(D)J recombination under control*. Immunol Rev, 2004. **200**: p. 165-81.
199. Lin, W.C. and S. Desiderio, *V(D)J recombination and the cell cycle*. Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 279-89.
200. Lauritsen, J.P., et al., *Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 176-90.
201. Fugmann, S.D., et al., *The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 495-527.
202. Gellert, M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 101-32.
203. Bassing, C.H. and F.W. Alt, *The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 781-96.
204. Lieber, M.R., et al., *Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 712-20.
205. Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt, *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S45-55.
206. Roth, D.B., *Restraining the V(D)J recombinase*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 656-66.
207. Aifantis, I., et al., *Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 159-69.
208. Irving, B.A., F.W. Alt, and N. Killeen, *Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains*. Science, 1998. **280**(5365): p. 905-8.

209. Jacobs, H., et al., *Domains of the TCR beta-chain required for early thymocyte development*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1833-43.
210. Pivniouk, V., et al., *Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76*. Cell, 1998. **94**(2): p. 229-38.
211. Molina, T.J., et al., *Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck*. Nature, 1992. **357**(6374): p. 161-4.
212. Cheng, A.M., et al., *The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9797-801.
213. Zhang, W., et al., *Essential role of LAT in T cell development*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 323-32.
214. Michie, A.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection*. Semin Immunol, 2002. **14**(5): p. 311-23.
215. Kruisbeek, A.M., et al., *Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions*. Immunol Today, 2000. **21**(12): p. 637-44.
216. Malissen, M., et al., *Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development*. Immunol Today, 1992. **13**(8): p. 315-22.
217. Levelt, C.N., et al., *Regulation of T cell receptor (TCR)-beta locus allelic exclusion and initiation of TCR-alpha locus rearrangement in immature thymocytes by signaling through the CD3 complex*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1257-61.
218. von Boehmer, H., et al., *Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(2): p. 135-42.
219. Aifantis, I., et al., *Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 403-9.
220. Dose, M., et al., *c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2669-77.
221. Voll, R.E., et al., *NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 677-89.
222. Goux, D., et al., *Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1726-33.
223. Gounari, F., et al., *Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 863-9.
224. Sicinska, E., et al., *Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias*. Cancer Cell, 2003. **4**(6): p. 451-61.
225. Hoffman, E.S., et al., *Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo*. Genes Dev, 1996. **10**(8): p. 948-62.

226. Lagresle, C., et al., *Transgenic expression of the p16(INK4a) cyclin-dependent kinase inhibitor leads to enhanced apoptosis and differentiation arrest of CD4-CD8- immature thymocytes*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2325-31.
227. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
228. Joza, N., G. Kroemer, and J.M. Penninger, *Genetic analysis of the mammalian cell death machinery*. Trends Genet, 2002. **18**(3): p. 142-9.
229. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
230. Bernardi, P., et al., *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 687-701.
231. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(8): p. 299-306.
232. Moore, N.C., et al., *Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus*. Immunology, 1994. **81**(1): p. 115-9.
233. Gratiot-Deans, J., et al., *Bcl-2 expression during T-cell development: early loss and late return occur at specific stages of commitment to differentiation and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10685-9.
234. Linette, G.P., et al., *Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9545-52.
235. Maraskovsky, E., et al., *Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1-/- mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1011-9.
236. Veis, D.J., et al., *Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair*. Cell, 1993. **75**(2): p. 229-40.
237. Mandal, M., et al., *The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 603-14.
238. Gonzalez, J., A. Orlofsky, and M.B. Prystowsky, *A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2679-85.
239. Zong, W.X., et al., *The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(4): p. 382-7.
240. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
241. Mombaerts, P., et al., *Characterization of immature thymocyte lines derived from T-cell receptor or recombination activating gene 1 and p53 double mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7420-4.
242. Guidos, C.J., et al., *V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors*. Genes Dev, 1996. **10**(16): p. 2038-54.

243. Haks, M.C., et al., *Pre-TCR signaling and inactivation of p53 induces crucial cell survival pathways in pre-T cells*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 91-101.
244. Zaugg, K., et al., *Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3805-10.
245. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2177-96.
246. Shiloh, Y., *The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(7): p. 402-10.
247. Levelt, C.N., R. Carsetti, and K. Eichmann, *Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 1867-75.
248. Levelt, C.N., et al., *Restoration of early thymocyte differentiation in T-cell receptor beta-chain-deficient mutant mice by transmembrane signaling through CD3 epsilon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11401-5.
249. Levelt, C.N., et al., *Regulation of thymocyte development through CD3: functional dissociation between p56lck and CD3 sigma in early thymic selection*. Immunity, 1995. **3**(2): p. 215-22.
250. Capone, M., et al., *TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events*. EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4335-46.
251. Wilson, A., W. Held, and H.R. MacDonald, *Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1355-60.
252. Petrie, H.T., et al., *Development of immature thymocytes: initiation of CD3, CD4, and CD8 acquisition parallels down-regulation of the interleukin 2 receptor alpha chain*. Eur J Immunol, 1990. **20**(12): p. 2813-5.
253. Vasseur, F., A. Le Campion, and C. Penit, *Scheduled kinetics of cell proliferation and phenotypic changes during immature thymocyte generation*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3038-47.
254. Penit, C. and F. Vasseur, *Sequential events in thymocyte differentiation and thymus regeneration revealed by a combination of bromodeoxyuridine DNA labeling and antimetabolic drug treatment*. J Immunol, 1988. **140**(10): p. 3315-23.
255. Petrie, H.T., et al., *T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 121-7.
256. Huang, C.Y., B.P. Sleckman, and O. Kanagawa, *Revision of T cell receptor {alpha} chain genes is required for normal T lymphocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14356-61.
257. Berger, M.A., et al., *Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3 delta is physically associated but not functionally required*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1461-7.
258. Penit, C., F. Vasseur, and M. Papiernik, *In vivo dynamics of CD4-8- thymocytes. Proliferation, renewal and differentiation of different cell subsets studied by DNA*

- biosynthetic labeling and surface antigen detection.* Eur J Immunol, 1988. **18**(9): p. 1343-50.
259. Nagaoka, H., W. Yu, and M.C. Nussenzweig, *Regulation of RAG expression in developing lymphocytes.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(2): p. 187-90.
 260. Huesmann, M., et al., *Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice.* Cell, 1991. **66**(3): p. 533-40.
 261. Ioannidis, V., et al., *The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival.* Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 691-7.
 262. Sun, Z., et al., *Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2369-73.
 263. Yelamos, J., et al., *PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes.* EMBO J, 2006. **25**(18): p. 4350-60.
 264. Ma, A., et al., *Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4763-7.
 265. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
 266. Ame, J.C., et al., *PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17860-8.
 267. Qiu, J.X., et al., *Separation-of-function mutants reveal critical roles for RAG2 in both the cleavage and joining steps of V(D)J recombination.* Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 77-87.
 268. Tsai, C.L., A.H. Drejer, and D.G. Schatz, *Evidence of a critical architectural function for the RAG proteins in end processing, protection, and joining in V(D)J recombination.* Genes Dev, 2002. **16**(15): p. 1934-49.
 269. Yarnell Schultz, H., et al., *Joining-deficient RAG1 mutants block V(D)J recombination in vivo and hairpin opening in vitro.* Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 65-75.
 270. Matei, I.R., C.J. Guidos, and J.S. Danska, *ATM-dependent DNA damage surveillance in T-cell development and leukemogenesis: the DSB connection.* Immunol Rev, 2006. **209**: p. 142-58.
 271. Rooney, S., J. Chaudhuri, and F.W. Alt, *The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development.* Immunol Rev, 2004. **200**: p. 115-31.
 272. Revy, P., et al., *The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models.* Adv Immunol, 2005. **87**: p. 237-95.
 273. Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek, *Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.* DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 997-1007.
 274. Kastan, M.B. and D.S. Lim, *The many substrates and functions of ATM.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 179-86.
 275. Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.* Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.

276. Bassing, C.H. and F.W. Alt, *H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity*. Cell Cycle, 2004. **3**(2): p. 149-53.
277. Thiriet, C. and J.J. Hayes, *Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair*. Mol Cell, 2005. **18**(6): p. 617-22.
278. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42462-7.
279. Arrowsmith, C.H., *Structure and function in the p53 family*. Cell Death Differ, 1999. **6**(12): p. 1169-73.
280. Jeffers, J.R., et al., *Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways*. Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 321-8.
281. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
282. Friedberg, E.C., *DNA damage and repair*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 436-40.
283. Pandita, T.K. and C. Richardson, *Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(5): p. 1363-77.
284. Danska, J.S., et al., *Biochemical and genetic defects in the DNA-dependent protein kinase in murine scid lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5507-17.
285. Nacht, M., et al., *Mutations in the p53 and SCID genes cooperate in tumorigenesis*. Genes Dev, 1996. **10**(16): p. 2055-66.
286. Bhandoola, A., et al., *Immature thymocytes undergoing receptor rearrangements are resistant to an Atm-dependent death pathway activated in mature T cells by double-stranded DNA breaks*. J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 891-7.
287. Barlow, C., et al., *Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia*. Cell, 1996. **86**(1): p. 159-71.
288. Matei, I.R., et al., *ATM deficiency disrupts Tcr α locus integrity and the maturation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1887-96.
289. Vacchio, M.S., et al., *ATM deficiency impairs thymocyte maturation because of defective resolution of T cell receptor α locus coding end breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6323-8.
290. Callen, E., et al., *ATM prevents the persistence and propagation of chromosome breaks in lymphocytes*. Cell, 2007. **130**(1): p. 63-75.
291. Chen, H.T., et al., *Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1962-5.
292. Borgulya, P., et al., *Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles*. Cell, 1992. **69**(3): p. 529-37.
293. Petrie, H.T., et al., *Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 615-22.
294. Turka, L.A., et al., *Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking*. Science, 1991. **253**(5021): p. 778-81.
295. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.

296. Hogquist, K.A. and M.J. Bevan, *The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection*. Semin Immunol, 1996. **8**(2): p. 63-8.
297. Anderson, G., K.M. Partington, and E.J. Jenkinson, *Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6599-603.
298. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 100-3.
299. Guo, J., et al., *Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 469-76.
300. Hare, K.J., E.J. Jenkinson, and G. Anderson, *CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3978-83.
301. Kydd, R., et al., *Intermediate steps in thymic positive selection. Generation of CD4-8+ T cells in culture from CD4+8+, CD4int8+, and CD4+8int thymocytes with up-regulated levels of TCR-CD3*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3806-14.
302. Lucas, B. and R.N. Germain, *Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 461-77.
303. Suzuki, H., et al., *Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 413-25.
304. Anderson, G., K.J. Hare, and E.J. Jenkinson, *Positive selection of thymocytes: the long and winding road*. Immunol Today, 1999. **20**(10): p. 463-8.
305. Sudo, T., et al., *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9125-9.
306. Backstrom, B.T., et al., *Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor*. Science, 1998. **281**(5378): p. 835-8.
307. Negishi, I., et al., *Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes*. Nature, 1995. **376**(6539): p. 435-8.
308. Witt, C.M., et al., *Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e160.
309. Ueno, T., et al., *CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 493-505.
310. Shores, E.W., W. Van Ewijk, and A. Singer, *Maturation of medullary thymic epithelium requires thymocytes expressing fully assembled CD3-TCR complexes*. Int Immunol, 1994. **6**(9): p. 1393-402.
311. Nasreen, M., et al., *In vivo treatment of class II MHC-deficient mice with anti-TCR antibody restores the generation of circulating CD4 T cells and optimal architecture of thymic medulla*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3394-400.
312. Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson, *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 772-82.

313. Palmer, E., *Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 383-91.
314. McGargill, M.A., J.M. Derbinski, and K.A. Hogquist, *Receptor editing in developing T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 336-41.
315. Hammerling, G.J., et al., *Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen*. Immunol Rev, 1991. **122**: p. 47-67.
316. Wang, F., C.Y. Huang, and O. Kanagawa, *Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11834-9.
317. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1720-3.
318. Baldwin, K.K., et al., *Negative selection of T cells occurs throughout thymic development*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 689-98.
319. Roberts, J.L., S.O. Sharrow, and A. Singer, *Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities*. J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 935-40.
320. Hoffmann, M.W., J. Allison, and J.F. Miller, *Tolerance induction by thymic medullary epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2526-30.
321. Hoffmann, M.W., et al., *Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9851-5.
322. van Meerwijk, J.P., et al., *Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 377-83.
323. Gao, E.K., D. Lo, and J. Sprent, *Strong T cell tolerance in parent----F1 bone marrow chimeras prepared with supralethal irradiation. Evidence for clonal deletion and anergy*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1101-21.
324. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
325. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 350-4.
326. Ramsey, C., et al., *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(4): p. 397-409.
327. Avichezer, D., et al., *An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance: major role for central selection mechanisms*. J Exp Med, 2003. **198**(11): p. 1665-76.
328. Klein, L., B. Roettinger, and B. Kyewski, *Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2476-86.

329. Gallegos, A.M. and M.J. Bevan, *Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1039-49.
330. Kurts, C., et al., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 923-30.
331. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
332. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. Nature, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
333. Zong, W.X., et al., *BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak*. Genes Dev, 2001. **15**(12): p. 1481-6.
334. Sentman, C.L., et al., *bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes*. Cell, 1991. **67**(5): p. 879-88.
335. Strasser, A., et al., *Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1376-80.
336. McCarty, N., et al., *Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 65-72.
337. Liu, Z.G., et al., *Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 281-4.
338. Woronicz, J.D., et al., *Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(11): p. 6364-76.
339. Calnan, B.J., et al., *A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection*. Immunity, 1995. **3**(3): p. 273-82.
340. Lee, S.L., et al., *Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77)*. Science, 1995. **269**(5223): p. 532-5.
341. Cheng, L.E., et al., *Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1865-75.
342. Teh, H.S., et al., *Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells*. Nature, 1988. **335**(6187): p. 229-33.
343. Singer, A., S. Adoro, and J.H. Park, *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 788-801.
344. Chan, S.H., et al., *Another view of the selective model of thymocyte selection*. Cell, 1993. **73**(2): p. 225-36.
345. Davis, C.B., et al., *Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes*. Cell, 1993. **73**(2): p. 237-47.
346. Itano, A., D. Kioussis, and E. Robey, *Stochastic component to development of class I major histocompatibility complex-specific T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 220-4.

347. Robey, E.A., et al., *Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage*. Cell, 1991. **64**(1): p. 99-107.
348. Matechak, E.O., et al., *MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 337-47.
349. Robey, E., et al., *Constitutive CD8 expression allows inefficient maturation of CD4+ helper T cells in class II major histocompatibility complex mutant mice*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1997-2004.
350. Chan, S.H., et al., *Role of coreceptors in positive selection and lineage commitment*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4482-9.
351. Itano, A., et al., *The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 731-41.
352. Shaw, A.S., et al., *The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain*. Cell, 1989. **59**(4): p. 627-36.
353. Wiest, D.L., et al., *Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1701-12.
354. Veillette, A., et al., *The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck*. Cell, 1988. **55**(2): p. 301-8.
355. Bommhardt, U., et al., *Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 715-22.
356. Broussard, C., et al., *Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 93-104.
357. Hernandez-Hoyos, G., et al., *Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment*. Immunity, 2000. **12**(3): p. 313-22.
358. Schaeffer, E.M., et al., *Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and selection*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 987-1000.
359. Sharp, L.L., et al., *The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 609-18.
360. Sohn, S.J., et al., *Activated p56lck directs maturation of both CD4 and CD8 single-positive thymocytes*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2209-17.
361. Wilkinson, B. and J. Kaye, *Requirement for sustained MAPK signaling in both CD4 and CD8 lineage commitment: a threshold model*. Cell Immunol, 2001. **211**(2): p. 86-95.
362. Love, P.E., J. Lee, and E.W. Shores, *Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3080-7.

363. Lundberg, K., et al., *Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4-8+TCRhi thymocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1643-51.
364. Brugnera, E., et al., *Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 59-71.
365. Liu, X. and R. Bosselut, *Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 280-8.
366. Sarafova, S.D., et al., *Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 75-87.
367. Park, J.H., et al., *'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1049-59.
368. Galera, P., et al., *c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21331-9.
369. He, X., et al., *CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 346-58.
370. Dave, V.P., et al., *HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8187-92.
371. Keefe, R., et al., *Regulation of lineage commitment distinct from positive selection*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1149-53.
372. He, X., et al., *The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment*. Nature, 2005. **433**(7028): p. 826-33.
373. Sun, G., et al., *The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 373-81.
374. Bartfeld, D., et al., *DNA recognition by the RUNX1 transcription factor is mediated by an allosteric transition in the RUNT domain and by DNA bending*. Structure, 2002. **10**(10): p. 1395-407.
375. Levanon, D. and Y. Groner, *Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4211-9.
376. Taniuchi, I., et al., *Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development*. Cell, 2002. **111**(5): p. 621-33.
377. Grueter, B., et al., *Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1694-705.
378. Kohu, K., et al., *Overexpression of the Runx3 transcription factor increases the proportion of mature thymocytes of the CD8 single-positive lineage*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2627-36.

379. Liu, X., et al., *Analyzing expression of perforin, Runx3, and Thpok genes during positive selection reveals activation of CD8-differentiation programs by MHC II-signaled thymocytes*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4465-74.
380. Sato, T., et al., *Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 317-28.
381. Setoguchi, R., et al., *Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development*. Science, 2008. **319**(5864): p. 822-5.
382. Hendriks, R.W., et al., *Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1912-8.
383. Hernandez-Hoyos, G., et al., *GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 83-94.
384. Nawijn, M.C., et al., *Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 715-23.
385. Pai, S.Y., et al., *Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 863-75.
386. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
387. Ueno, T., et al., *Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 205-18.
388. Kato, S., *Thymic microvascular system*. Microsc Res Tech, 1997. **38**(3): p. 287-99.
389. Egerton, M., R. Scollay, and K. Shortman, *Kinetics of mature T-cell development in the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2579-82.
390. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
391. Rincon, M., R.A. Flavell, and R.J. Davis, *Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2490-7.
392. Alberola-Ila, J., et al., *Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 620-3.
393. O'Shea, C.C., et al., *Raf regulates positive selection*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2350-5.
394. Swan, K.A., et al., *Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes*. EMBO J, 1995. **14**(2): p. 276-85.
395. Alberola-Ila, J., et al., *Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 9-18.
396. Priatel, J.J., et al., *RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 617-27.

397. Wen, B.G., et al., *Inositol (1,4,5) trisphosphate 3 kinase B controls positive selection of T cells and modulates Erk activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5604-9.
398. Fischer, A.M., et al., *The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 431-43.
399. Bommhardt, U., et al., *MEK activity regulates negative selection of immature CD4+CD8+ thymocytes*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2326-37.
400. Mariathasan, S., et al., *Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1060-8.
401. Crompton, T., K.C. Gilmour, and M.J. Owen, *The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte*. Cell, 1996. **86**(2): p. 243-51.
402. Michie, A.M., et al., *Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by the pre-T cell receptor in developing thymocytes in vivo*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1647-56.
403. Sharp, L.L. and S.M. Hedrick, *Commitment to the CD4 lineage mediated by extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase and lck signaling*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6598-605.
404. Adachi, S. and M. Iwata, *Duration of calcineurin and Erk signals regulates CD4/CD8 lineage commitment of thymocytes*. Cell Immunol, 2002. **215**(1): p. 45-53.
405. Kaye, J., *Regulation of T cell development in the thymus*. Immunol Res, 2000. **21**(2-3): p. 71-81.
406. Nishida, T., et al., *The novel murine CD4+CD8+ thymocyte cell line exhibits lineage commitment into both CD4+ and CD8+ T cells by altering the intensity and the duration of anti-CD3 stimulation in vitro*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6634-41.
407. Rincon, M., et al., *The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1817-30.
408. Sabapathy, K., et al., *JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development*. Curr Biol, 1999. **9**(3): p. 116-25.
409. Dan, I., et al., *Molecular cloning of MINK, a novel member of mammalian GCK family kinases, which is up-regulated during postnatal mouse cerebral development*. FEBS Lett, 2000. **469**(1): p. 19-23.
410. Diehl, N.L., et al., *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 321-34.
411. Sen, J., et al., *Intrathymic signals in thymocytes are mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4535-8.
412. Sugawara, T., et al., *Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes*. Immunity, 1998. **9**(4): p. 565-74.

413. Fernandez, E., *Thymocyte development past the CD4(+)CD8(+) stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase*. *Blood*, 2000. **95**(4): p. 1356-61.
414. Tanaka, N., et al., *Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(8): p. 785-91.
415. Mulroy, T. and J. Sen, *p38 MAP kinase activity modulates alpha beta T cell development*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(10): p. 3056-63.
416. Hsu, S.C., et al., *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in different stages of thymocyte development*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 970-6.
417. Pedraza-Alva, G., et al., *Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint*. *EMBO J*, 2006. **25**(4): p. 763-73.
418. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. *Science*, 2008. **320**(5876): p. 667-70.
419. Beardmore, V.A., et al., *Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(23): p. 10454-64.
420. Sabio, G., et al., *p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP*. *EMBO J*, 2005. **24**(6): p. 1134-45.
421. Sohn, S.J., G.M. Lewis, and A. Winoto, *Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis*. *EMBO J*, 2008. **27**(13): p. 1896-906.
422. Winoto, A. and D.R. Littman, *Nuclear hormone receptors in T lymphocytes*. *Cell*, 2002. **109 Suppl**: p. S57-66.
423. Mosmann, T.R., et al., *Differentiation and functions of T cell subsets*. *Ciba Found Symp*, 1997. **204**: p. 148-54; discussion 154-8.
424. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 337-48.
425. Schlienger, K., et al., *Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3490-8.
426. Thery, C. and S. Amigorena, *The cell biology of antigen presentation in dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(1): p. 45-51.
427. Krogsgaard, M., J. Juang, and M.M. Davis, *A role for "self" in T-cell activation*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(4): p. 236-44.
428. Surh, C.D. and J. Sprent, *Regulation of naive and memory T-cell homeostasis*. *Microbes Infect*, 2002. **4**(1): p. 51-6.
429. Tough, D.F. and J. Sprent, *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1127-35.
430. Freitas, A.A. and B.B. Rocha, *Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition*. *Immunol Today*, 1993. **14**(1): p. 25-9.
431. Di Rosa, F., et al., *On the lifespan of virgin T lymphocytes*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1253-7.
432. Takeda, S., et al., *MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span*. *Immunity*, 1996. **5**(3): p. 217-28.

433. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
434. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
435. Dorfman, J.R., et al., *CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 329-35.
436. Stefanova, I., J.R. Dorfman, and R.N. Germain, *Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes*. Nature, 2002. **420**(6914): p. 429-34.
437. Jameson, S.C., *T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful*. Semin Immunol, 2005. **17**(3): p. 231-7.
438. Stockinger, B., G. Kassiotis, and C. Bourgeois, *Homeostasis and T cell regulation*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 775-9.
439. Polic, B., et al., *How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8744-9.
440. Seddon, B. and R. Zamoyka, *TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2997-3005.
441. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
442. Witherden, D., et al., *Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 355-64.
443. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer, *Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1269-75.
444. Labrecque, N., et al., *How much TCR does a T cell need?* Immunity, 2001. **15**(1): p. 71-82.
445. Kondrack, R.M., et al., *Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1797-806.
446. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis, *T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo*. Int Immunol, 2001. **13**(6): p. 763-8.
447. Burchill, M.A., et al., *Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5853-64.
448. Kelly, J., et al., *A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 210-7.
449. Kieper, W.C., et al., *Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1533-9.
450. Goldrath, A.W., et al., *Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1515-22.

451. Marrack, P. and J. Kappler, *Control of T cell viability*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 765-87.
452. Sohn, S.J., et al., *Requirement for Jak3 in mature T cells: its role in regulation of T cell homeostasis*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2130-8.
453. Thomis, D.C. and L.J. Berg, *The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(4): p. 541-7.
454. Thomis, D.C., W. Lee, and L.J. Berg, *T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4708-19.
455. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
456. Boise, L.H., et al., *Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **200**: p. 107-21.
457. Boise, L.H., et al., *Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5491-5.
458. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
459. Bouillet, P., et al., *Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 645-53.
460. Wojciechowski, S., et al., *Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1665-75.
461. von Freeden-Jeffry, U., et al., *The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression*. Immunity, 1997. **7**(1): p. 147-54.
462. Khaled, A.R. and S.K. Durum, *Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 817-30.
463. Khaled, A.R., et al., *Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 561-73.
464. Chipuk, J.E., et al., *Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20327-32.
465. Kuo, C.T., M.L. Veselits, and J.M. Leiden, *LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1986-90.
466. Schober, S.L., et al., *Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3662-7.
467. Egawa, T., et al., *The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1945-57.
468. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.

469. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 297-322.
470. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
471. Le Gros, G., et al., *Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 921-9.
472. Seder, R.A., et al., *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10188-92.
473. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 445-80.
474. Azuma, M., et al., *B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28*. Nature, 1993. **366**(6450): p. 76-9.
475. Freeman, G.J., et al., *Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2185-92.
476. Freeman, G.J., et al., *B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells*. J Immunol, 1989. **143**(8): p. 2714-22.
477. Linsley, P.S., et al., *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 721-30.
478. Noel, P.J., et al., *CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 636-42.
479. Chambers, C.A. and J.P. Allison, *Co-stimulation in T cell responses*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 396-404.
480. Godfrey, W.R., et al., *Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 757-62.
481. Kuhlman, P., et al., *The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation*. J Immunol, 1991. **146**(6): p. 1773-82.
482. Pollok, K.E., et al., *Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 771-81.
483. Boise, L.H., et al., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 87-98.
484. Mueller, D.L., et al., *Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells*. J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1764-71.

485. Kerstan, A. and T. Hunig, *Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1341-5.
486. Vershelde, C., et al., *Al/Bfl-1 expression is restricted to TCR engagement in T lymphocytes*. Cell Death Differ, 2003. **10**(9): p. 1059-67.
487. June, C.H., et al., *Role of the CD28 receptor in T-cell activation*. Immunol Today, 1990. **11**(6): p. 211-6.
488. Sytwu, H.K., R.S. Liblau, and H.O. McDevitt, *The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice*. Immunity, 1996. **5**(1): p. 17-30.
489. Van Parijs, L., A. Ibraghimov, and A.K. Abbas, *The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 321-8.
490. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 759-67.
491. Pellegrini, M., et al., *Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14175-80.
492. Alves, N.L., et al., *The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 703-16.
493. Lefebvre, D.C., et al., *The noncatalytic domains of Lck regulate its dephosphorylation by CD45*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1650**(1-2): p. 40-9.
494. Lin, J. and A. Weiss, *T cell receptor signalling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 2): p. 243-4.
495. Acuto, O. and D. Cantrell, *T cell activation and the cytoskeleton*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 165-84.
496. Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson, *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 220-8.
497. Ruland, J. and T.W. Mak, *Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 93-100.
498. Appleman, L.J., et al., *CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 144-51.
499. Michel, F., et al., *CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 935-45.
500. Kane, L.P., J. Lin, and A. Weiss, *Signal transduction by the TCR for antigen*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 242-9.
501. DeSilva, D.R., et al., *Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4175-81.
502. Lilic, M., et al., *CD8(+) T cell cytolytic activity independent of mitogen-activated protein kinase / extracellular regulatory kinase signaling (MAP kinase / ERK)*. Eur J Immunol, 1999. **29**(12): p. 3971-7.

503. Agrawal, A., et al., *ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5788-96.
504. Nekrasova, T., et al., *ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2374-80.
505. D'Souza, W.N., et al., *The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7617-29.
506. Su, B., et al., *JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes*. Cell, 1994. **77**(5): p. 727-36.
507. Weiss, L., et al., *Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 139-46.
508. Yang, D.D., et al., *Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2*. Immunity, 1998. **9**(4): p. 575-85.
509. Sun, Z., et al., *PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 402-7.
510. Werlen, G., et al., *Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3101-11.
511. Jacinto, E., G. Werlen, and M. Karin, *Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 31-41.
512. Li, B., et al., *Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2219-22.
513. Dong, C., et al., *Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2092-5.
514. Conze, D., et al., *c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 811-23.
515. Arbour, N., et al., *c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 signaling pathways have divergent roles in CD8(+) T cell-mediated antiviral immunity*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 801-10.
516. Gao, Y., et al., *JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5783-9.
517. Dodeller, F. and H. Schulze-Koops, *The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(2): p. 205.
518. Rincon, M., et al., *Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway*. EMBO J, 1998. **17**(10): p. 2817-29.
519. Merritt, C., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 936-46.
520. Farley, N., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2118-29.

521. Garaude, J., et al., *ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7607-17.
522. Garaude, J., et al., *The role of ERK5 in T-cell signalling*. Scand J Immunol, 2005. **62**(6): p. 515-20.
523. Sohn, S.J., et al., *Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(19): p. 8553-66.
524. Ananieva, O., et al., *ERK5 regulation in naive T-cell activation and survival*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2534-47.
525. Mack, K.D., et al., *Functional identification of kinases essential for T-cell activation through a genetic suppression screen*. Immunol Lett, 2005. **96**(1): p. 129-45.
526. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
527. Trautmann, S. and D. McCollum, *Cell cycle: new functions for Cdc14 family phosphatases*. Curr Biol, 2002. **12**(21): p. R733-5.
528. Kipreos, E.T., *Developmental quiescence: Cdc14 moonlighting in G1*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 693-5.
529. Saito, R.M., et al., *The CDC-14 phosphatase controls developmental cell-cycle arrest in C. elegans*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 777-83.
530. Lin, W.C. and S. Desiderio, *Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2733-7.
531. Li, Z., et al., *A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 575-89.
532. Barnes, D.E., et al., *Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice*. Curr Biol, 1998. **8**(25): p. 1395-8.
533. Difilippantonio, M.J., et al., *DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 510-4.
534. Frank, K.M., et al., *Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 173-7.
535. Gao, Y., et al., *A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis*. Cell, 1998. **95**(7): p. 891-902.
536. Gu, Y., et al., *Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 653-65.
537. Nussenzweig, A., et al., *Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 551-5.
538. Rooney, S., et al., *Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice*. Mol Cell, 2002. **10**(6): p. 1379-90.
539. Zhu, C., et al., *Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates*. Cell, 1996. **86**(3): p. 379-89.

540. Stiff, T., et al., *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
541. Wang, H., et al., *Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors*. J Cell Physiol, 2005. **202**(2): p. 492-502.
542. Mirzayans, R., D. Severin, and D. Murray, *Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **66**(5): p. 1498-505.
543. Xu, Y., et al., *Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma*. Genes Dev, 1996. **10**(19): p. 2411-22.
544. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
545. Jacks, T., et al., *Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice*. Curr Biol, 1994. **4**(1): p. 1-7.
546. Barlow, C., et al., *Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 453-6.
547. Yin, B. and C.H. Bassing, *The sticky business of histone H2AX in V(D)J recombination, maintenance of genomic stability, and suppression of lymphoma*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 29-40.
548. Huber, A., et al., *PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1103-8.
549. Menisser-de Murcia, J., et al., *Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1828-32.
550. Dantzer, F., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase activity is not affected in ataxia telangiectasia cells and knockout mice*. Carcinogenesis, 1999. **20**(1): p. 177-80.
551. Morrison, C., et al., *Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 479-82.
552. Plotkin, J., et al., *Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4521-7.
553. Michie, S.A., E.A. Kirkpatrick, and R.V. Rouse, *Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus*. J Exp Med, 1988. **168**(5): p. 1929-34.
554. Wang, L., et al., *Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1122-30.
555. Aliahmad, P. and J. Kaye, *Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 245-56.

556. Veiga-Fernandes, H. and B. Rocha, *High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 31-7.
557. Broome, H.E., et al., *Apoptosis and Bcl-2 expression in cultured murine splenic T cells*. Immunology, 1995. **84**(3): p. 375-82.
558. Deng, G. and E.R. Podack, *Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2189-93.
559. Nakayama, K., et al., *Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3700-4.
560. Nakayama, K., et al., *Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice*. Science, 1993. **261**(5128): p. 1584-8.
561. Grayson, J.M., et al., *Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8⁺ T cells*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 3950-4.
562. Miles, P.D., et al., *Impaired insulin secretion in a mouse model of ataxia telangiectasia*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(1): p. E70-4.
563. Postic, C., et al., *Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 305-15.
564. Ray, M.K., et al., *A mouse model for beta cell-specific ablation of target gene(s) using the Cre-loxP system*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(1): p. 65-9.

